BEEINFLUSSUNG DES ARACHIDONSÄUREMETABOLISMUS VON STIMULIERTEN MAKROPHAGEN UND LEUKOCYTEN DURCH ENTZÜNDUNGSHEMMENDE METHANSULFONANILIDE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Harald Werner
aus Witten

Berlin 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549620_0016

BEEINFLUSSUNG DES ARACHIDONSÄUREMETABOLISMUS VON STIMULIERTEN MAKROPHAGEN UND LEUKOCYTEN DURCH ENTZÜNDUNGSHEMMENDE METHANSULFONANILIDE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Harald Werner
aus Witten

Berlin 1985

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Fenner

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Wurm

3. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1985

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Entzündungspharmakologie und Immunbiologie der Schering AG, Berlin, durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, anregende Diskussionen sowie großzügige Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Fenner sowie Frau Dr. I. Böttcher besonders herzlich.

Mein Dank gilt außerdem dem Leiter der Abteilung Entzündungspharmakologie und Immunbiologie, Herrn Dr. M. Töpert, sowie allen Mitarbeitern, besonders Frau M. Ulrich, Frau R. Schmidt, Frau E. Fiedler, Frau D. Siebler, Herrn Dr. W. Fröhlich, Herrn U. Klein, Herrn E. Matzke, Herrn H. Hübner und Herrn Dr. O. Schiemann für ihre wertvolle Hilfe.

meinen Eltern und Martina

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Literaturübersicht 4

2.1 Mögliche Angriffspunkte, um den Arachidonsäurestoffwechsel zu beeinflussen 4

2.1.1 Hemmung der Substratfreisetzung aus Phospholipiden 4

2.1.1.1 Stabilisierung der Membranen 4
2.1.1.2 Inhibition der Phospholipasen 4

2.1.2 Hemmung der Bildung des Prostaglandinendoperoxids (PGG_2) 5

2.1.2.1 Kompetitive Substratverdrängung 5
2.1.2.2 Hemmung der Cyclooxygenase 6

2.1.3 Hemmung des Prostaglandinendoperoxidmetabolismus 6

2.1.4 Hemmung des Lipoxygenaseweges 6

2.2 Substanzen mit Einfluß auf den Arachidonsäurestoffwechsel 7

2.2.1 Substanzen, die die Freisetzung der Arachidonsäure aus Phospholipiden hemmen 7

2.2.1.1 Membranstabilisatoren 7
2.2.1.2 Phospholipase-A_2-Hemmstoffe 7

2.2.2 Substanzen, die die Bildung von PGG_2 hemmen 8

2.2.2.1 Substratanaloga 8
2.2.2.2 Hemmstoffe des Enzyms Cyclooxygenase 9

2.2.3 Substanzen mit Einfluß auf den PGG_2- und PGH_2-Metabolismus 11

2.2.3.1 Hemmstoffe des Enzyms Prostacyclinsynthetase 11
2.2.3.2 Hemmstoffe des Enzyms Thromboxansynthetase 12
2.2.3.3 Hemmstoffe der Enzyme Prostaglandin E_2- und PGD_2-Isomerase 12

2.2.4 Substanzen, die den Lipoxygenaseweg beeinflussen 12

2.3 In-vitro-Modelle zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus von NSE 15

2.3.1 Gewebehomogenate und subzelluläre Fraktionen 15

2.3.1.1 Gewebehomogenate 15
2.3.1.2 Subzelluläre Fraktionen 16

2.3.2 Entzündungsrelevante Zellen 17

2.3.2.1 Thrombocyten 18
2.3.2.2 Granulocyten 19
2.3.2.3 Makrophagen 22
2.3.2.4 Zellinien 25

2.4 Identifizierung und quantitative Bestimmung von Eicosanoiden 25
2.5 Methansulfonanilide: chemische Struktur und entzündungshemmende Eigenschaften 27

2.5.1 Übersicht über Strukturen 27
2.5.2 Bisherige Ergebnisse zur in-vivo-Aktivität 29

2.5.2.1 Carrageenin-Ödem- und Adjuvans-Arthritis-Test 29
2.5.2.2 Ulcerogenes Potential 31
2.5.3 Bisherige Ergebnisse zur in-vitro-Aktivität 32

2.6 Eigene Untersuchungen 34

3. Materialien und Methoden 37

3.1 Chemikalien 37
3.2 Nährmedien, Puffer und Serum 37
3.3 Geräte und allgemeine Arbeitsbedingungen 38
3.4 Dünnschichtchromatographie 39
3.5 Stimulatoren 42
3.6 Wirkstoffe 42
3.7 1-^{14}C-Arachidonsäure und radioaktive Metaboliten 47
3.8 Extraktion von Eicosanoiden aus Kieselgelschichten 47
3.9 Peritonealmakrophagenmodell 48

3.9.1 Herkunft der Peritonealmakrophagen 51
3.9.2 Isolierung der Peritonealmakrophagen 52
3.9.3 Substratlösung 53
3.9.4 Messung der Aufnahmequote des Substrates in die Zellen 54

3.9.5 Wirkstofflösungen 54
3.9.6 Stimulussuspension 55
3.9.7 Testansatz 55
3.9.8 Extraktion 55
3.9.9 Dünnschichtchromatographische Trennung 56
3.9.10 Detektion 56
3.9.11 Identifizierung der Metaboliten der Peritonealmakrophagenstimulation 57
3.9.12 Quantitative Verteilung der extrahierten Metaboliten 61

3.10 Granulocytenmodell 62

3.10.1 Granulocytenherkunft 63
3.10.2 Isolierung der Granulocyten 64
3.10.3 Versuchsansätze 68

3.10.3.1 Wirkstofflösungen 69
3.10.3.2 Zellsuspension 69
3.10.3.3 Substratlösung 69
3.10.3.4 Stimuluslösung 70

3.10.4 Inkubation 70
3.10.5 Extraktion 70
3.10.6 Dünnschichtchromatographische Trennung 71
3.10.7 Detektion 71
3.10.8 Identifizierung der Metaboliten der Granulocytenstimulation 72

3.10.8.1 Dünnschichtchromatographie 72
3.10.8.2 Bioassay 75

3.10.9 Quantitative Verteilung der extrahierten Metaboliten 76

3.11 Auswertung 77

4. Ergebnisse und Diskussion 78

4.1 Peritonealmakrophagenmodell: Nachweis der Angriffspunkte der "Standardsubstanzen" im Vergleich zu Methansulfonaniliden 78

4.1.1 "Standardsubstanzen" 78

4.1.1.1 Hemmstoffe des Enzyms Cycloocygenase 78
4.1.1.2 Hemmstoffe von Cyclooxygenase und Lipoxygenase 84
4.1.1.3 Radikalfänger 89

4.1.2 Methansufonanilide: Charakterisierung im Makrophagenmodell und Struktur-Wirkungs-Beziehungen 91

4.1.2.1 Nimesulid (ZK 73705) 91
4.1.2.2 Indanderivat (ZK 31534) 91
4.1.2.3 4-Fluorphenoxyindanderivat (ZK 33612) 94
4.1.2.4 2,4-Difluorphenoxyindanderivat (ZK 37442) 95
4.1.2.5 1-Hydroxyindane (ZK 32743, ZK 91182) 96
4.1.2.6 1-Oxoindane (ZK 34228, ZK 38997) 98
4.1.2.7 1-Oxo-3-hydroxyindane (ZK 98063, ZK 98062) 100
4.1.2.8 Trifluormethanderivate (ZK 91228, ZK 91697) 102

4.2 Granulocytenmodell 104

4.2.1 "Standardsubstanzen": Einfluß auf die Bildung von Lipoxygenaseprodukten 104

4.2.1.1 Hemmstoffe des Enzyms Cyclo-oxygenase 104
4.2.1.2 Hemmstoffe des Enzyms Lipoxy-genase 106
4.2.1.3 Radikalfänger 109

4.2.2 Methansufonanilide 111

4.3 Vergleich des Cyclooxygenasehemmpotentials in vitro mit der antiinflammatorischen Wirksamkeit in vivo 113

5. Zusammenfassung 135

6. Literaturverzeichnis 140

1. Einleitung

Im Jahre 1971 wurde von VANE der Zusammenhang zwischen den antirheumatischen und analgetischen Effekten nichtsteroidaler Entzündungshemmer (NSE) und deren Fähigkeit, die Prostaglandinbiosynthese aus Arachidonsäure zu hemmen, hergestellt. Diese Entdeckung gab der Erforschung des Arachidonsäuremetabolismus einen starken Impuls. So wurde die weitere Aufklärung des Fettsäurecyclooxygenaseweges erreicht, der von der Arachidonsäure über Cycloendoperoxidzwischenstufen (15-Hydroperoxy-Prostaglandin-Endoperoxid, PGG_2 und 15-Hydroxy-Prostaglandin-Endoperoxid, PGH_2) zu den Prostaglandinen (PG), Prostacyclin (PGI_2), Thromboxanen (TxA_2 und TxB_2) und der 12S-Hydroxyheptadekatriensäure (HHT) plus Malonsäuredialdehyd (MDA) führt. (Siehe Abbildung 1.)

Mit der Entdeckung von Lipoxygenasen des Säugetierorganismus (12-Lipoxygenase 1975 von NUGTEREN in Thrombocytensuspension beschrieben, 5-Lipoxygenase in Kaninchengranulocytensuspension 1976 von BORGEAT et al.) wurde eine weitere Palette von Arachidonsäuremetaboliten aufgezeigt.

Die Lipoxygenasen, für die wie bei den schon seit vielen Jahren bekannten Pflanzenlipoxygenasen (vor allem aus Fabaceaen z.B. Soja-Bohnen, - Überblick siehe VELDINCK et al., 1977) eine Penta-1.4-dien-Struktur des Substrates Voraussetzung ist, verstoffwechseln Arachidonsäuren über Hydroperoxidzwischenstufen (Hydroperoxyeicosatetraensäure, HPETE) zu den entsprechenden Hydroxysäuren (Hydroxyeicosatetraensäure, HETE), sowie zu den Leukotrienen (LT).
Deren Strukturgleichheit (LTC_4 und LTD_4) mit dem bei allergischen Bronchospasmen auftretenden Mediator Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) wurde nach der Isolierung

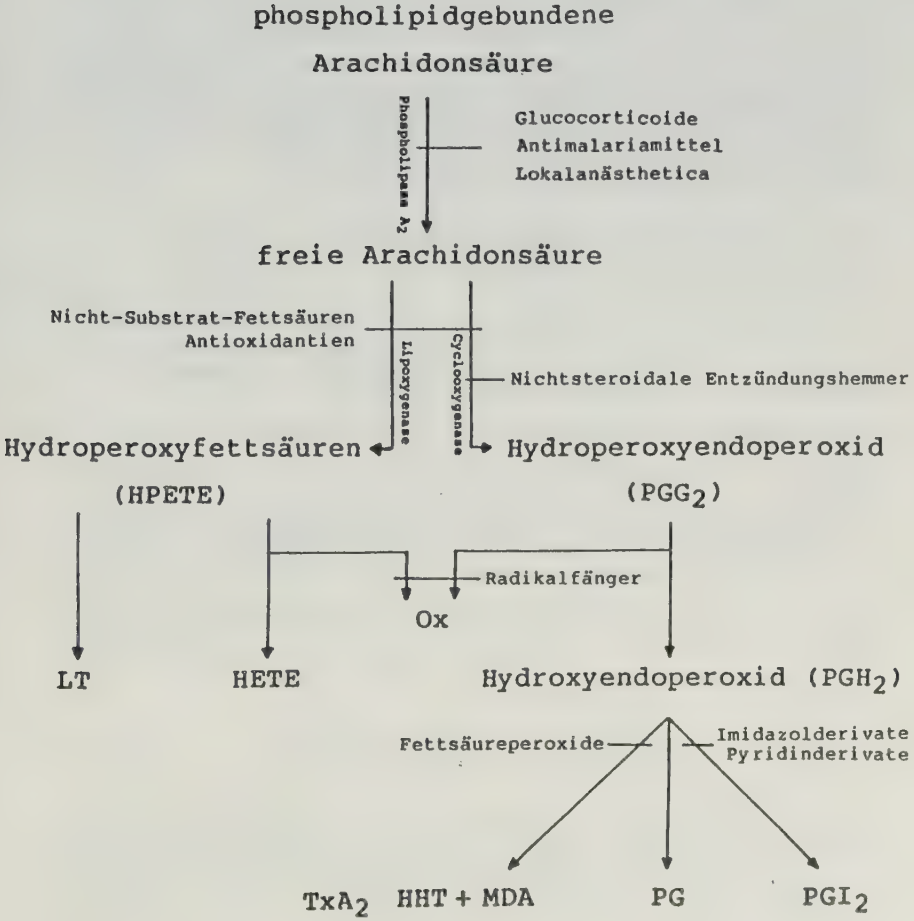
von SRS-A durch MORRIS et al. (1978) von der Arbeitsgruppe um SAMUELSSON festgestellt (HAMMERSTRÖM et al., 1979, MURPHY et al., 1979).

Die Kenntnis dieser im entzündlichen und immunologischen Geschehen aktiven Metaboliten der Arachidonsäure bewirkte eine intensive Suche nach Verbindungen, deren Wirkungsmechanismus sich von der selektiven Cyclooxygenasehemmung, wie sie von VANE für die bis dahin bekannten NSE beschrieben wurde, unterscheidet.

Dazu kommt, daß sich die Wirkung der NSE nicht nur auf entzündetes Gewebe beschränkt, sondern sie systemische Wirkungen entfalten.
Diese werden für ihre gemeinsamen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht. Das sind vor allem die Magen-Darm-Unverträglichkeiten der NSE (FERREIRA und VANE, 1979), aber auch deren mögliche Beeinflussung des Immunsystems, die durch die Aktivierung der T-Supressor-Lymphocyten durch Prostaglandine gegeben ist (WEBB et al., 1981).

Welche Möglichkeiten bieten sich, um den Arachidonsäurestoffwechsel zu beeinflussen?

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Metabolismus von Arachidonsäure über den Cyclooxygenase- und den Lipoxygenaseweg (Arachidonsäurekaskade). Beeinflussung durch Fremdsubstanzen.



2. Literaturübersicht

2.1 Mögliche Angriffspunkte, um den Arachidonsäurestoffwechsel zu beeinflussen

2.1.1 Hemmung der Substratfreisetzung aus Phospholipiden

Da nur freie Arachidonsäure als Substrat für Cyclooxygenase und Lipoxygenase von Bedeutung ist, der Hauptanteil der im Organismus vorkommenden Arachidonsäure aber membrangebunden in Phospholipiden vorliegt, ist für die Biosynthese der Arachidonsäuremetaboliten die Mobilisierung dieser Fettsäuren aus ihren endogenen Speichern erforderlich.

Um die Bereitstellung freier Arachidonsäure zu behindern, sind zwei Möglichkeiten gegeben.

2.1.1.1 Stabilisierung der Membranen

Zerstörung von Membranstrukturen durch Trauma oder Entzündung führt zur Aktivierung der Arachidonsäure freisetzenden Phospholipasen. Dadurch ist bei Zellschädigung ein vermehrtes Angebot an freier Arachidonsäure zu beobachten. Gelingt es, die Membranstruktur zu stabilisieren, kann dadurch auch die weitere Verstoffwechselung der Arachidonsäure verhindert werden.

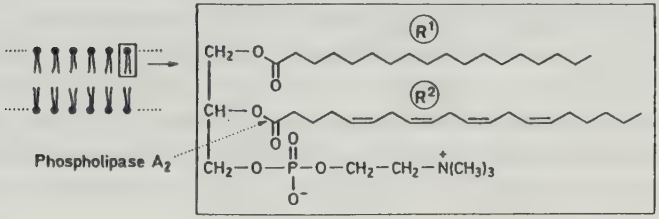
2.1.1.2 Inhibition der Phospholipasen

Die Bereitstellung freier Arachidonsäure als unmittelbarer Vorstufe für Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseprodukte erfolgt über die Aktivierung Ca^{2+}-abhängiger Phospholipasen, vor allem Phospholipase A_2.

Sie spaltet den Fettsäurerest in Position 2 des Phospholipides, der Hauptbindungsstelle für die ungesättigten Fettsäuren - speziell Arachidonsäure - ab. (Siehe Abbildung 2.)

Wird die Phospholipaseaktivität vermindert, kommt es zu einer Abnahme der Eicosanoidbildung.

Abbildung 2: Wirkung von Phospholipase A_2. Sie setzt die als R^2 gebundene, ungesättigte Fettsäure aus ihrer Bindung an das Phospholipid (hier Phosphatidylcholin = Lecithin) frei. R^1 ist meist eine gesättigte Fettsäure (nach SCHROR, 1983).



2.1.2 Hemmung der Bildung des Prostaglandinendoperoxides PGG_2

Die Prostaglandinendoperoxidbildung kann auf zwei verschiedenen Wegen beeinflußt werden.

2.1.2.1 Kompetitive Substratverdrängung

Die Umwandlung der freien Arachidonsäure zum Endoperoxid PGG_2 erfolgt unter Katalyse des Enzyms Cyclooxygenase. Interferenz mit dem Substrat Arachidonsäure um die Bindungsstellen an der Cyclooxygenase behindert deren Umsetzung zum PGG_2.

2.1.2.2 Hemmmung der Cyclooxygenase

Der andere Weg, die Umsetzung freier Arachidonsäure zu PGG_2 zu verhindern, ist die Hemmung der Aktivität des beteiligten Enzyms Prostaglandinendoperoxidsynthetase (= Cyclooxygenase).

2.1.3 Hemmung des Prostaglandinendoperoxidmetabolismus

An der Transformation der Endoperoxide PGG_2 bzw. dem Hydroxyendoperoxid PGH_2 sind je nach Zell- oder Gewebeart verschiedene Enzyme beteiligt. Bei gegebenem Zelltypus ist der Endoperoxidmetabolismus bestimmt durch Substratmenge sowie Art und Aktivität der beteiligten Enzyme und Kofaktoren (LANDS, 1979). Die wichtigsten Enzyme für die weitere Umwandlung der Endoperoxide sind die Prostacyclinsynthetase (--> PGI_2), die Thromboxansynthetase (--> TxA_2, HHT und MDA) und die Prostaglandin E_2- und PGD_2-Isomerase (--> PGE_2, --> PGD_2).

Durch spezifische Hemmung eines dieser Enzyme lassen sich die teilweise einander antagonisierenden Wirkungen der einzelnen Metaboliten nach der einen oder anderen Seite hin verschieben.

2.1.4 Hemmung des Lipoxygenaseweges

Ebenso wie bei der Fettsäurecyclooxygenase wird für die Umwandlung der Arachidonsäure über den Lipoxygenaseweg freies, d.h. nicht an Phospholipide gebundenes Substrat benötigt. Daher ist prinzipiell eine Hemmung dieses Stoffwechselweges mit denselben Mechanismen wie unter 2.1.1 und 2.1.2.1 beschrieben möglich: durch Stabilisierung der Membranen, Inhibition der

Phospholipasen oder durch kompetitive Substratverdrängung, nun aber an den Bindungsstellen des Enzyms Lipoxygenase.

Eine direkte Hemmung der Lipoxygenase führt zur Reduzierung der Produktion von Hydroxysäuren und Leukotrienen, während ein vermindertes Angebot an Glutathion die Biosynthese der glutathion substituierten Leukotriene hemmt (ROUZER et al., 1981).

2.2 Substanzen mit Einfluß auf den Arachidonsäurestoffwechsel

2.2.1 Substanzen, die die Freisetzung der Arachidonsäure aus Phospholipiden hemmen

2.2.1.1 Membranstabilisatoren

Die Arachidonsäurefreisetzung aus ihrer Bindung an Phospholipide kann mit hohen Dosierungen von Lokalanästhetika und psychotropen Pharmaka, wie z.B. Chlorpromazin, behindert werden (KUNZE et al., 1974). Diesen Effekt zeigen auch die Antimalariamittel wie Quinacrin und Chloroquin (FLOWER und BLACKWELL, 1976). Man erklärt diese Eigenschaft der Substanzen mit ihrer membranstabilisierenden Wirkung. Sie können sich mit ihrer amphiphilen Kationenstruktur membranstabilisierend in die ebenfalls amphiphilen Phospholipide einlagern und damit substratbehindernd den Angriff der Phospholipasen erschweren.

2.2.1.2 Phospholipase-A_2-Hemmstoffe

Entzündungshemmende Corticosteroide behindern über einen indirekten Mechanismus die Aktivierung von arachidonsäurefreisetzenden Phospholipasen. Nach Passage der Zellmembran werden die Glucocorticoide an ein Rezeptorprotein im Cytoplasma ge-

bunden. Im Zellkern stimuliert dieser Komplex die RNS-Bildung mit anschließender Synthese eines Proteins (Makrocortin oder Lipmodulin), das seinerseits die Phospholipase hemmt (MELBY, 1977; CARNUCCIO et al., 1981, FLOWER u. BLACKWELL, 1979; HIRATA et al., 1980). Daher wird in Zellhomogenaten die Prostaglandinsynthese durch Corticosteroide nicht beeinflußt. Dazu sind intakte Zellen notwendig (FLOWER et al., 1972a). Bei diesen wird durch exogenen Arachidonsäurezusatz die Hemmwirkung auf die Eicosanoidbildung aufgehoben (FLOWMAN u. ZOR, 1976). Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Hemmung der Cyclooxygenasefunktion durch Corticosteroide. Durch diesen Mechanismus nehmen die Glucocorticoide Einfluß auf die Biosynthese sowohl der Prostaglandine und Thromboxane als auch auf die Bildung von Hydroxyfettsäuren und Leukotrienen.

2.2.2 Substanzen, die die Bildung von PGG_2 hemmen

2.2.2.1 Substratanaloga

Das Substrat der Cyclooxygenase, die die Bildung der Endoperoxide und damit die der Prostaglandine katalysiert, ist die Arachidonsäure (C20:4 ω-6). Fettsäuren mit ähnlicher Struktur interferieren kompetitiv mit dem Substrat um die Bindungsstellen an der Cyclooxygenase ("Nicht-Substrat-Fettsäuren"), wodurch die Produktbildung vermindert wird (Beispiel: Eicosapentaensäuren; (C20:5 ω-3; Linolensäuretyp). Oder sie sind selbst Substrat für die Cyclooxygenase wie die Fettsäuren vom Linolsäuretyp (C18:2 ω-6), was einen zusätzlichen Enzymaktivitätsverlust durch Autoxidation bedeutet (LANDS et al., 1973). Verschiedene Acetylenfettsäuren sind auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden, die Prostaglandinbiosynthese zu hemmen. 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA) ist dabei die am besten erforschte Modellsubstanz (TOBIAS u. HAMILTON, 1979), die sich auch hemmend auf die Umsetzung von Arachidonsäuren über den Lipoxygenaseweg auswirkt.

2.2.2.2 Hemmstoffe des Enzyms Cyclooxygenase

Der gemeinsame Wirkungsmechanismus von NSE beruht auf deren Eigenschaft, die Fettsäurecyclooxygenase zu hemmen. Die Inaktivierung kann, wie im Falle der Acetylsalicylsäure (ASS) irreversibel sein. ASS acetyliert eine Aminogruppe im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase (ROTH et al., 1975), was bei Thrombocyten, die ohne einen Zellkern nicht in der Lage sind, Enzymprotein neu zu synthetisieren, zu einer permanenten Blockade dieses Stoffwechselweges führt. Die Acetylierung der Cyclooxygenase kann z.B. durch Indometacin, aber auch durch Strukturanaloga der Acetylsalicylsäure wie Diflunisal behindert werden (HUMES et al., 1981). Diese Untersuchungen sprechen für eine antagonistische Wirkungsweise der anderen NSE.

Substanzen mit einem kompetitiven, reversiblen Wirkungsmechanismus in Bezug auf die Cyclooxygenase weisen unterschiedliche Strukturmerkmale auf.

Carbonsäuren:

Die Mehrzahl der NSE sind Carbonsäuren. Dazu gehören Salicylsäurederivate (wie ASS, Salicylamid, Diflunisal) und N-Phenylanthranilsäureabkömmlinge (Fenamate) wie die Mefenaminsäure.

Eine weitere Gruppe bilden die Phenylessigsäurederivate (z.B. Diclofenac). 2-Phenylpropionsäuren und 2-Heteroarylpropionsäuren werden als Profene zusammengefaßt. Für einen der Vertreter dieser Substanzklasse, das Benoxaprofen, konnte neben der Wirkung auf die Cyclooxygenase auch ein lipoxygenasehemmender Effekt nachgewiesen werden (WALKER und DAWSON, 1981). In die Gruppe der Heteroarylessigsäuren gehört die neben der ASS heute am besten untersuchte Substanz Indometacin.

Zahlreiche Abwandlungen der Struktur des Indometacins wurden vorgenommen, um dem Ziel eines besseren therapeutischen Indexes als Quotient aus ulcerogener Dosis durch entzündungshemmende Dosis näher zu kommen. Eine Strukturveränderung mit diesem Ziel ist das Pirazolac (BIERE et al., 1982).

Enole:

Unter dieser Bezeichnung lassen sich zwei Gruppen von NSE zusammenfassen, nämlich die schon älteren Pyrazolidin-3,5-dione (z.B. Phenylbutazon, Azapropazon) sowie die neueren Substanzen aus der Gruppe der Oxicame, mit dem zur Zeit in der Klinik am niedrigsten dosierten NSE Piroxicam.

Andere Substanzklassen:

Neuere entzündungshemmend wirkende Substanzen sind diarylsubstituierte Fünfring-Heterocyclen wie das Flumizol, Tiflamizol, Ditazol und Oxaprozin.

Tierexperimentell und in in-vitro-Modellen eingehend untersuchte Substanzen sind Wirkstoffe mit Pyrazolstruktur und solche mit Phenolstruktur.
Zu den Pyrazolen gehören Phenidon und BW 755C, die sowohl die Cyclooxygenase als auch die Lipoxygenase hemmen (HIGGS et al., 1979). Phenolische Antioxidantien wie das MK 447 wirken als "Radikalfänger", indem sie mit Lipidperoxiden und den bei der Reaktion von PGG_2 zu PGH_2 sowie den bei der Umwandlung von HPETE zu HETE bzw. LTA_4 entstehenden Sauerstoffradikalen reagieren (siehe Abbildung 1).
Dadurch wird in manchen in-vitro-Modellen die Transformation von PGG_2 zu PGH_2 und damit auch die Bildung von Endoperoxidprodukten gefördert (KUEHL et al., 1977).

Zusätzlich ist aber auch eine cyclooxygenasehemmende Wirkung von MK 447 beobachtet worden (LANDS und HANEL, 1982). Welcher Mechanismus für die nachgewiesene antiinflammatorische Wirkung von MK 447 verantwortlich ist, ist unklar, da bei Untersuchungen Stereoisomerer von MK 447-Analoga nur die (+)-Formen antiphlogistische Wirkungen zeigten, beide optischen Isomere jedoch gleichstarke radikalbindende Eigenschaften aufwiesen (PAYNE et al., 1982).

2.2.3 Substanzen mit Einfluß auf den PGG_2- und PGH_2 - Metabolismus

Eine Vielzahl von Substanzen ist in der Lage, die im Körper ubiquitär vorkommende Cyclooxygenase und damit die weitere Verstoffwechselung ihrer Produkte, der Endoperoxide, zu den Prostaglandinen und Thromboxanen zu hemmen (siehe 2.2.2.2). Dagegen sind erst wenige Wirkstoffe bekannt, die selektiv eines der Enzyme beeinflussen, die für die weitere Verstoffwechselung von PGG_2 und PGH_2 verantwortlich sind.

2.2.3.1 Hemmstoffe des Enzyms Prostacyclinsynthetase

Die enzymatische Bildung von Prostacyclin wird in vitro stark und selektiv durch 15-HPETE, einem 15-Lipoxygenaseprodukt, gehemmt (MONCADA et al., 1976a). Andere Fettsäureperoxide besitzen diese Eigenschaft ebenfalls (GRYGLEWSKI et al., 1976). Tranylcypromin ist in vitro ein weiterer, allerdings wesentlich schwächerer Prostacyclinsynthetasehemmer ($IC_{50} > 10^{-3}$ mol/l; GRYGLEWSKI et al., 1976).

In in-vivo-Versuchen sowohl mit Tranylcypromin (RAJTAR und DE GAITANO, 1978) als auch mit den Hydroperoxiden (DUSTING et

al., 1978) als selektiven Prostacyclinsynthetasehemmstoffen konnte ihnen diese Eigenschaft allerdings nicht nachgegewiesen werden.

2.2.3.2 Hemmstoffe der Thromboxansynthetase

Die Eigenschaft der Thromboxansynthetasehemmung ist für verschiedene Substanzen in in-vitro- und in-vivo-Versuchen beschrieben worden. Während für Benzydamin (MONCADA et al., 1976b) und N-0164 (EAKINS et al., 1977) auch Cyclooxygenaseinhibition nachgewiesen wurde, erreichte man eine erhöhte Selektivität gegenüber diesem Enzym bei einigen Pyridinderivaten (z.B. Nictindol; GRYGLEWSKY et al., 1977), Derivaten des Imidazols (z.B. Dazoxiben; RANDALL et al., 1981) sowie bei Strukturanaloga von Prostaglandinendoperoxiden und Thromboxanen (z.B. 9,11-Diazoprostan-5,13-diensäure; GORMAN et al., 1977).

2.2.3.3 Hemmstoffe der Enzyme PGE_2- und PGD_2-Isomerase

Die Möglichkeit einer selektiven Inhibition der anderen am weiteren Metabolismus der Endoperoxide beteiligten Enzyme ist bisher für keine Substanz beschrieben worden.

2.2.4 Substanzen, die den Lipoxygenaseweg beeinflussen

Wirkstoffe, die Einfluß auf die Bereitstellung freier Arachidonsäure haben, behindern die Synthese von Lipoxygenaseprodukten ebenso wie die der Cyclooxygenase. Das sind membranstabilisierende Substanzen (siehe 2.2.1.1) und Phospholipase-A_2-Hemmstoffe (siehe 2.2.1.2).

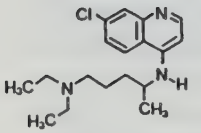
Da Cyclooxygenase und Lipoxygenase das gleiche Substrat verstoffwechseln, nehmen Substratanaloga, wie unter 2.2.2.1 erwähnt, ebenfalls Einfluß auf die Hydroperoxydierung der Arachidonsäure durch Lipoxygenasen. Dabei hemmt ETYA beide Stoffwechselwege (HAMBERG und SAMUELSSON, 1974), während 4,7,10,13-Eicosatetrainsäure (SUN et al., 1981) und 5,8,11-Eicosatriinsäure (HAMMERSTRÖM, 1977) Selektivität für Lipoxygenasen aufweisen.

Hemmstoffe der Lipoxygenase sind unter den Antioxidantien zu finden wie zum Beispiel α-Naphthol, Guajacol, α-Tocopherol sowie der am besten untersuchte Wirkstoff aus dieser Gruppe, die Nordihydroguajaretsäure (NDGA; PANGANAMALA et al., 1977). Auch bei Flavonoiden (BAUMANN et al., 1980) wurde eine Hemmwirkung auf die Lipoxygenase beobachtet.

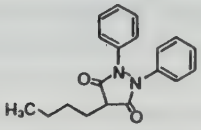
Andere Substanzen, für die sowohl die Inhibition des Lipoxygenaseweges als auch die der Bildung von Prostaglandinen nachgewiesen wurde, gehören unterschiedlichen Substanzklassen an. Diese Eigenschaften zeigen Pyrazole wie Phenidon und das noch eingehender untersuchte BW 755C (HIGGS et al., 1979), das Thiazolderivat Timegadin (AHNFELT-RØNNE und ARRIGONI-MARTELLI, 1980), der ß-Naphtholabkömmling Nafazatrom (HONN und DUNN, 1982) sowie die 2-Phenylpropionsäure Benoxaprofen (WALKER und DAWSON, 1981).

Für ein endogenes Lipoxygenaseprodukt, 15-HETE, ist sowohl eine 12-Lipoxygenasehemmung (VANDERHOEK et al., 1980a) als auch 5-Lipoxygenasehemmung (VANDERHOEK et al., 1980b) nachgewiesen worden. Einen hemmenden Einfluß auf die 5-Lipoxygenase und damit auf die Leukotrienbildung zeigt auch das Strukturanaloge zu LTA_4, 5,6-Methano-LTA_4 (ARAI et al., 1983).

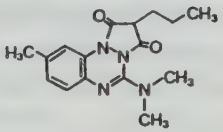
Abbildung 3: Strukturen einiger Substanzen, die den Arachidonsäurestoffwechsel beeinflussen.



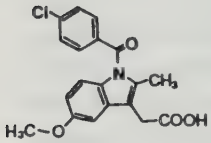
Chloroquin



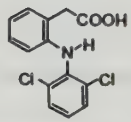
Phenylbutazon



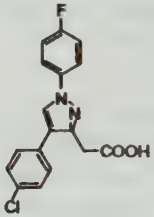
Azapropazon



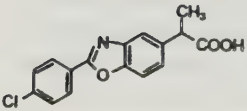
Indometacin



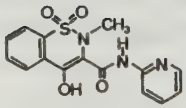
Diclofenac



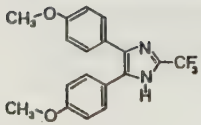
Pirazolac



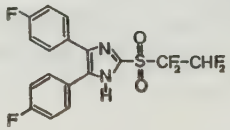
Benoxaprofen



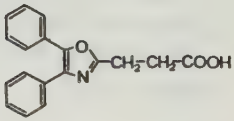
Piroxicam



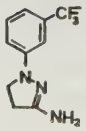
Flumizol



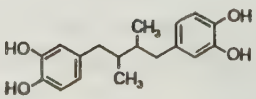
Tiflamizol



Oxaprozin

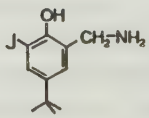


BW 755C



NDGA

Nordihydroguajaretsäure



MK 447

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Bildung glutathionsubstituierter Leukotriene ist in vitro durch Glutathionentzug möglich (ROUZER et al., 1981).

2.3 In-vitro-Modelle zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus von NSE

2.3.1 Gewebehomogenate und subzelluläre Fraktionen

Um die Beeinflussung der Bildung von Eicosanoiden durch Wirkstoffe zu untersuchen, sind Gewebehomogenate und subzelluläre Fraktionen geeignet; um Informationen zum Wirkungsmechanismus zu erhalten, kann man Präparationen von Mitochondrien, endoplasmatischem Reticulum oder des Cytosols benutzen.

In der Aufhebung der Kompartimentierung der Zelle, die durch intakte Zellstrukturen gegeben ist, liegt für einige Fragestellungen ein Vorteil, zum Beispiel bei der separaten Untersuchung von Lipoxygenase oder Cyclooxygenase.

Soll jedoch der Metabolismus der Arachidonsäure, die Substrat für beide Enzyme ist, als Ganzes dargestellt werden, erweist sich die Aufhebung der Kompartimentierung als Nachteil. Dadurch ist eine Korrelation zwischen Daten, die in solchen Modellen erhalten wurden, mit den entzündungshemmenden Eigenschaften im Tierversuch selten gegeben und Aussagen über die zu erwartende Wirkung von NSE in in-vivo-Modellen kaum zu machen.

2.3.1.1 Gewebehomogenate

Bei seiner Entdeckung des Zusammenhanges zwischen Prostaglandinbiosynthese und deren Hemmung durch NSE verwendete VANE

(1971) Meerschweinchenlungenhomogenat. Andere Gewebehomogenate wurden seither von verschiedenen Autoren auf ihre Fähigkeit zur Prostaglandinsynthese und deren Beeinflussung durch NSE untersucht (Beispiel: Kaninchengehirnhomogenat, FLOWER und VANE, 1972b; Kaninchennierenhomogenat, BLOCK et al., 1975; Kaninchengranulocytenhomogenat, HIGGS et al., 1975; Rattenlungen- und -milzhomogenate zur Bestimmung der Lipoxygenasehemmung, BAUMANN et al., 1980).

2.3.1.2 Subzelluläre Fraktionen

Mikrosomenfraktion

Die Cyclooxygenase liegt membrangebunden im endoplasmatischen Reticulum vor. Daher dienen als Quelle für dieses Enzym häufig Mikrosomenpräparationen aus Schaf- (SAMUELSSON et al., 1967; SMITH und LANDS, 1971) und Rindersamenblasen (TAKEGUCHI et al., 1971; TAKEGUCHI und SIH, 1972). In diesen Modellen erfolgt die Metabolisierung der Arachidonsäure hauptsächlich zu PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$.

Die Enzympräparation kann frisch, gefriergetrocknet, aber auch als Aceton-Pentan-Präparation (WALLACH und DANIELS, 1971) verwendet werden.

Dabei muß Arachidonsäure als Substrat jeweils zugegeben werden, und die Reaktion ist pH-abhängig (Optimum pH 8,0 - 8,3). Kofaktoren wie Glutathion und Hydrochinon beschleunigen den Umsatz von Arachidonsäure zu den Prostaglandinen, ohne Kofaktoren ist es möglich, auch die Prostaglandinendoperoxidzwischenstufen zu bestimmen.

Cytosol-Fraktion

Im Gegensatz zur membrangebundenen Cyclooxygenase liegt die Lipoxygenase als gelöstes Enzym im Cytosol vor (NUGTEREN, 1975).

Modelle zur Untersuchung der Beeinflussung von Lipoxygenasen verwenden daher die Cytosol-Fraktion von lysierten Zellen, vor allem von Thrombocyten (NUGTEREN, 1975).

2.3.2 Entzündungsrelevante Zellen

Die Untersuchung von Zellen und Zellkulturen tritt im Gegensatz zu den reinen Enzymmodellen immer mehr in den Vordergrund.

Der Vorteil von ganzen Zellen ist, daß sie nicht auf die Zufuhr von exogenem Substrat angewiesen sind und keine Kofaktoren benötigen und damit bei solchen Modellen "physiologischere" Bedingungen herrschen als bei Mikrosomen- oder Cytosolpräparationen. Ein Nachteil besteht darin, daß möglicherweise potente NSE an Zellmembranen gebunden werden und die Enzyme nicht erreichen (RAZ et al., 1973).

Allerdings ist auch bei Modellen mit ganzen Zellen eine Übertragung der erhaltenen Befunde auf den Gesamtorganismus nur mit großen Einschränkungen möglich, da ein großer Teil der natürlichen modifizierenden Einflüsse auf die Zellfunktionen fehlt.

Thrombocyten, Granulocyten, Makrophagen und permanente Zelllinien werden am meisten zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus von NSE benutzt.

2.3.2.1 Thrombocyten

Thrombocyten sind viel untersuchte Objekte des Arachidonsäuremetabolismus.
Als Quelle dient vor allem menschliches Blut, aber auch Pferde-, Rinder-, Hunde-, Ratten-Thrombocyten und Blutplättchen anderer Spezies sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Thrombocytenaggregation, ausgelöst durch verschiedene Stimuli wie Arachidonsäure, ADP, Kollagen oder Epinephrin bewirkt die Metabolisierung freigesetzter Arachidonsäure über den Cyclooxygenase- und den Lipoxygenaseweg (HAMBERG und SAMUELSSON, 1974).

Durch die Cyclooxygenase vermittelte Reaktion wird Arachidonsäure zu den Prostaglandinendoperoxiden PGG_2 und PGH_2 oxidiert (HAMBERG und SAMUELSSON, 1974). Die weitere Metabolisierung der Endoperoxide erfolgt in Blutplättchen hauptsächlich mittels der Thromboxansynthetase zu TxA_2 (HAMBERG et al., 1975). Das im physiologischen Milieu aus dem darin instabilen TxA_2 entstehende Hydrolyseprodukt ist TxB_2 (HAMBERG et al., 1975).

Die Thromboxansynthetase katalysiert auch die Bildung von 12-Hydroxy-5,8,10-heptadekatriensäure (HHT) und Malonsäuredialdehyd (MDA) (DICZFALUSY et al., 1977).

Ferner sind die Prostaglandine E_2 und F_2 als Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure über die Cyclooxygenase nachgewiesen worden.

12-HETE entsteht durch die Aktivität einer C12-Lipoxygenase über die 12-HPETE-Zwischenstufe (HAMBERG und SAMUELSSON, 1974). Ferner sind bei hohen exogenen Arachidonsäurenkon-

zentrationen verschiedener Trihydroxysäuren beschrieben worden (JONES et al., 1978; BRYANT und BAYLEY, 1980).

2.3.2.2 Granulocyten

Als Quelle für Untersuchungen an diesen Blutzellen dient das periphere Blut, zum Beispiel von Mensch und Schwein, aber auch Peritonealexsudat von Kaninchen und Ratte nach Anreicherung dieser Zellen durch Injektion eines Irritans (z.B. Thioglycolat) in die Bauchhöhle.

Als Stimulus für die Anregung metabolischer Leistungen dient neben einer Reihe phagocytierbarer Partikel (Latex, Zymosan A, u.a.) hauptsächlich das Calcium Ionophor A 23187, ein Antibioticum, das in hohem Maße die Fähigkeit divalenter Kationen steigert, biologische Membranen zu durchwandern.

Menschliche Granulocyten aus dem peripheren Blut metabolisieren Arachidonsäure unter dem Einfluß von Calcium Ionophor A 23187 hauptsächlich über den Lipoxygenaseweg zu zwei hydroxylierten Eicosanoiden, nämlich 5S-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) und 5S,12R-Dihydroxyeicosatetraensäure (5S,12R-DiHETE, Leukotrien B_4, LTB_4; BORGEAT und SAMUELSSON, 1979a; STENSON und PARKER, 1979; Leukotriennomenklatur nach SAMUELSSON, 1979, 1980). In einer C5-Lipoxygenasereaktion wird 5S-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) gebildet, die äusserst instabil ist (BORGEAT et al., 1983). 5-HPETE erfährt zum einen eine Umwandlung in die stabile 5-HETE, zum anderen in das instabile Allylepoxid, die 5,6-Oxidoeicosatetraensäure (Leukotrien A_4, LTA_4; BORGEAT und SAMUELSSON, 1979b). Das stellt die Schlüsselsubstanz für die Leukotrienbildung dar. In einer Hydrolasereaktion entsteht aus LTA_4 das LTB_4 (RÅDMARK et al., 1980; Abbildung 4).

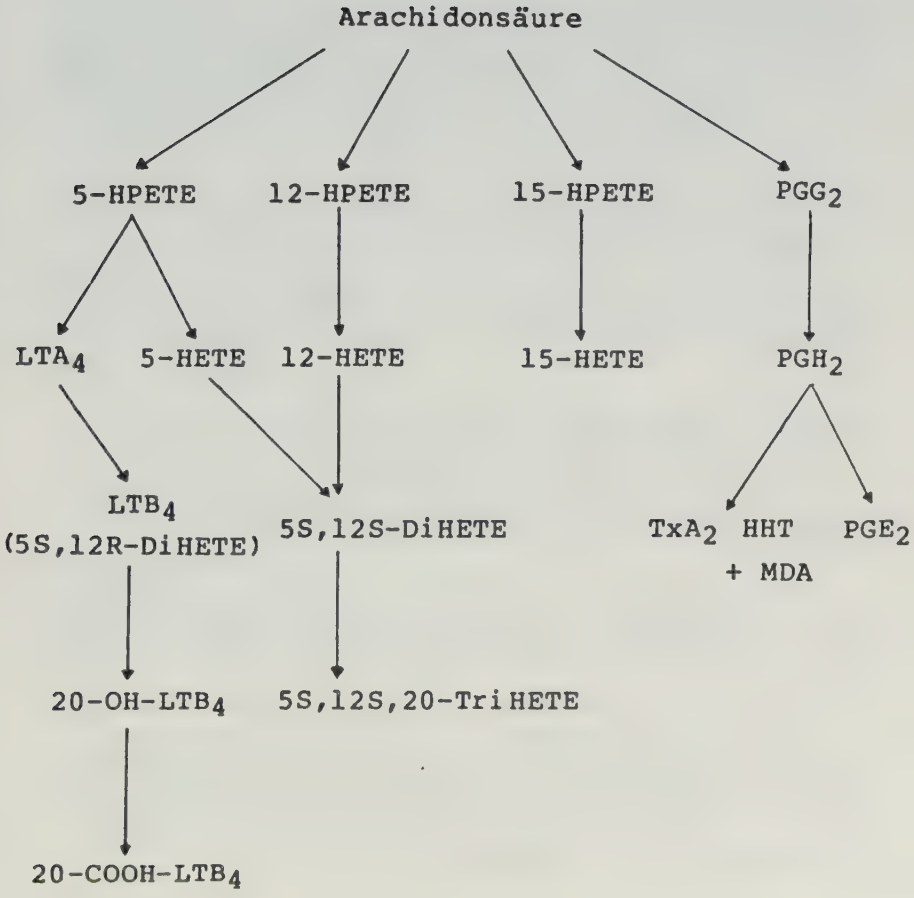
Weitere Metaboliten der Arachidonsäure bei der Stimulation von humanen Granulocyten mit A 23187 sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden, machen aber nur einen geringen Teil der metabolisierten Arachidonsäure aus oder sind nicht eindeutig den Granulocyten als Metaboliten zuzuordnen, da herkömmliche Granulocytenpräparationen immer mit mehr oder weniger vielen Thrombocyten verunreinigt sind und die gleichen Metaboliten auch von Blutplättchen aus Arachidonsäure metabolisiert werden.

5S,12S-Dihydroxyeicosatetraensäure (5S,12S-DiHETE, ein Isomeres des LTB_4) wurde von BORGEAT et al. (1982) sowie LINDGREN et al. (1981) beschrieben. Es entsteht durch doppelte Oxidation in C5- und C12-Lipoxygenase-vermittelten Reaktionen.

Außerdem wurde 12-Hydroxyheptadekatriensäure (HHT), 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE), Thromboxan B_2 und Prostaglandin E_2 entdeckt (STENSON und PARKER, 1979). Die von BORGEAT und SAMUELSSON (1979a) isolierte 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) ist möglicherweise nicht das Produkt einer 15-Lipoxygenasereaktion, sondern dasjenige einer Cyclooxygenasereaktion. RANDALL et al. (1980) vermuten, daß es durch Peroxidation an C15 nach Lösen eines H an C13 entsteht, wenn keine nachfolgende Cyclisierung zu einem cyclischen Endoperoxid eintritt. Es entsteht also möglicherweise durch eine unvollständige Cyclooxygenasereaktion.

Sowohl LTB_4, also 5S,12R-DiHETE, als auch 5S,12S-DiHETE werden weiter metabolisiert und inaktiviert durch ω-Oxidation an C20 zum 20-OH-LTB_4 und 20-COOH-LTB_4 bzw. zur 5S,12S,20-Trihydroxyeicosatetraensäure. Diese Produkte sind von LINDGREN et al. (1981), HANSSON et al. (1981) und CLAESSON et al. (1981) in humanen Leukocytenpräparationen gefunden worden.

Abbildung 4: Arachidonsäuremetabolismus durch neutrophile Granulocyten des Menschen.



2.3.2.3 Makrophagen

Makrophagen werden zum überwiegenden Teil aus der Peritonealhöhle gewonnen. Vor allem Peritonealmakrophagen der Spezies Maus, Ratte und Meerschweinchen werden benutzt.

Zu verstärkter Stoffwechselaktivität werden diese Phagocyten durch Calcium Ionophor A 23187, Phorbolester und Phythämagglutinine angeregt, vor allem aber durch phagocytierbare Teilchen, wie Zymosan A, Partikel aus Zellwandmaterial von Saccharomyces cerevisiae.

Murine Peritonealmakrophagen metabolisieren exogen zugeführte Arachidonsäure nach ihrer Freisetzung aus Phospholipiden unter dem Einfluß von Zymosan A in Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-vermittelten Reaktionen zu verschiedenen Substanzen. (Abbildung 5).

Als Hauptmetaboliten des Cyclooxygenaseweges konnten HUMES et al. (1977) Prostaglandin E_2 (PGE_2) und in geringerer Menge auch 6-Keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-Keto-$PGF_{1\alpha}$) als das stabile Abbauprodukt des Prostacyclins (PGI_2; DUSTING et al., 1977) isolieren.

Diesen Produkten einer Cyclooxygenase-vermittelten Reaktion stehen die Metaboliten von Reaktionen mit Lipoxygenasen gegenüber.

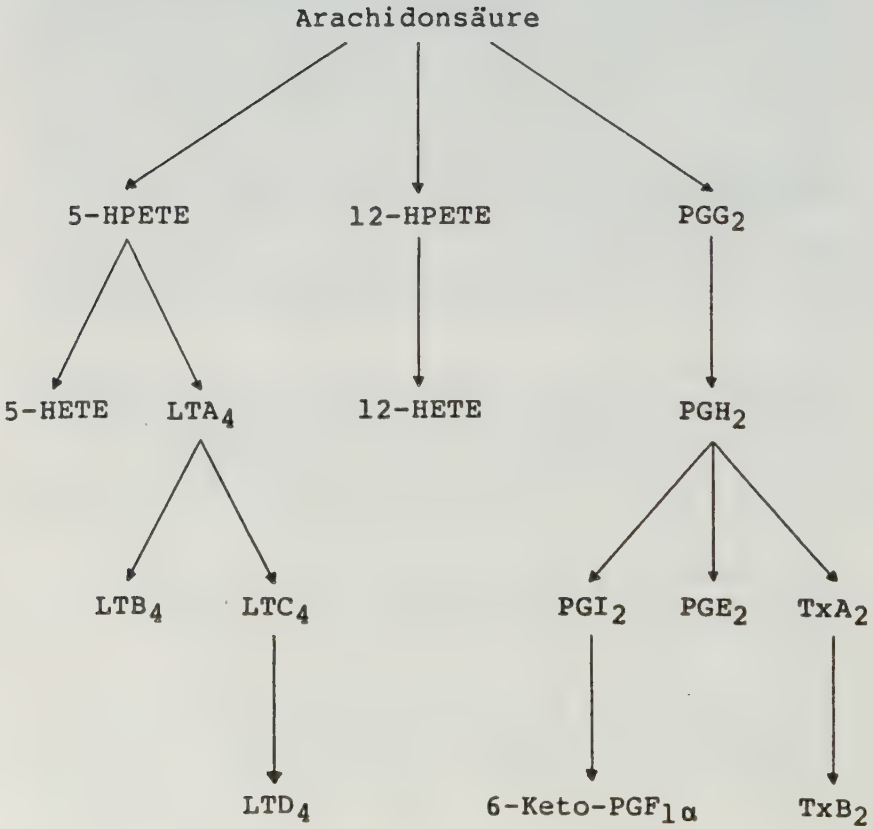
So wurde von der Arbeitsgruppe um RIGOUD (1979) die Umwandlung von Arachidonsäure zu 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) durch den Einfluß einer C12-Lipoxygenase bei murinen Peritonealmakrophagen beschrieben.

In einer C5-Lipoxygenasereaktion entsteht als instabiles Zwischenprodukt 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE; BORGEAT et al., 1983). Diese Hydroperoxysäure wird zum Teil über das ebenfalls instabile Allylepoxid, die 5,6-Oxidoeicosatetraensäure (Leukotrien A_4, LTA_4) entweder zu einer Dihyhydroxysäure, dem Leukotrien B_4 (LTB_4) metabolisiert, die HUMES et al. (1982) im Überstand von murinen Makrophagen bestimmen konnten, oder es entstehen Arachidonsäurederivate mit einer Cystein enthaltenden Seitenkette. ROUZER et al. (1980) wiesen die Bildung von Leukotrien C_4 (LTC_4, 5-Hydroxy-6-S-glutathionyleicosatetraensäure) aus dem Überstand von Zymosan-A-stimulierten Peritonealmakrophagenkulturen nach und ROUBIN et al. (1981, 1982) konnte daraus Leukotrien D_4 (LTD_4, 5-Hydroxy-6-S-cysteinylglycyleicosatetraensäure) isolieren.

5-HPETE kann zum anderen Teil zur stabilen 5-HETE reagieren, die von DOIG et al. (1980) in Peritonealmakrophagenkulturen nachgewiesen wurde.

Thromboxan B_2 (TxB_2), das stabile Abbauprodukt des instabilen Thromboxan A_2 (TxA_2; HAMBERG et al., 1975), das ebenfalls über den Cyclooxygenaseweg entsteht, wurde von BRUNE et al. (1978) nach Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen durch antikörperbeladene Erythrocyten aus dem Überstand isoliert. Thromboxan B_2 konnte allerdings nach Stimulation dieser Zellen mit Zymosan A nicht beobachtet werden (HUMES et al., 1977). Diese Beobachtungen zeigen ebenso wie die Untersuchungen und Vergleiche von BOCKMANN (1981), wie entscheidend sich die in-vitro-Kulturbedingungen und unterschiedliche Stimuli der Makrophagenaktivierung auf die Zusammensetzung des Metabolitenspektrums auswirken.

Abbildung 5: Stoffwechselwege der Arachidonsäure durch Zymosan-A-stimulierte Peritonealmakrophagen der Maus.



2.3.2.4 Zellinien

Permanente Zellinien aus verschiedenartigen Tumoren werden vielfach zum Studium des Metabolismus von Arachidonsäure und des Wirkungsmechanismus von NSE benutzt. Einer Reihe von Vorteilen stehen Nachteile gegenüber.

So sind solche Zellen jederzeit durch entsprechende in-vitro-Vermehrung in nahezu unbegrenzter Anzahl verfügbar. Es müssen keine Tiere getötet werden. Das Metabolitenspektrum ist bei immer gleichbleibender Behandlung und Kultivierung der Zellen konstant, wodurch gut miteinander vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Nachteilig ist zu bewerten, daß Tumorzellinien auch in ihrer Physiologie entartete Zellen darstellen und mit ihnen erhaltene Befunde daher noch weniger Relevanz aufweisen als Ergebnisse von Untersuchungen an "gesunden" Zellen. Ihr Metabolitenspektrum unterscheidet sich sowohl qualitativ als auch quantitativ zum Teil erheblich von dem "normaler" Zellen.

2.4 Identifizierung und quantitative Bestimmung von Eicosanoiden

Die Identifizierung und quantitative Bestimmung von Arachidonsäure und ihrer Metaboliten kann mit biologischen, chemischen, radiochromatographischen und radioimmunologischen Bestimmungsverfahren erfolgen. Auch Kombinationen einzelner Methoden miteinander werden benutzt. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Prinzipien, Vor- und Nachteile sowie die Hauptanwendungsgebiete der Eicosanoidbestimmungsmethoden.

Tabelle 1: Methoden zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Eicosanoiden (nach SCHROR, 1983)

Verfahren	Prinzip	wesentliche Vorteile	wesentliche Nachteile	Hauptanwendung
Bioassay	Messung der biologischen Aktivität an "target organs", meist glatte Muskeln oder Blutplättchen	· direkte und unmittelbare Bestimmung des aktiven Prinzips auch bei kurzlebigen Verbindungen · Möglichkeit der zeitlichen Zuordnung zu anderen Funktionsparametern · wenig aufwendig	· begrenzte Selektivität · kein Nachweis inaktiver Verbindungen · Inferferenz anderer, biologisch aktiver Substanzen prinzipiell möglich	· Basisforschung · In-vitro- und · In-vivo-(Tier) Bestimmung von instabilen, biologisch aktiven Metaboliten · Pharmakatestung z.B. Screening
GC-MS	gaschromatographische Auftrennung mit nachfolgender Massenanalyse	· hohe Spezifität · als einziges der genannten Verfahren zur Strukturaufklärung geeignet	· apparate- und zeitaufwendig infolge notwendiger Reinigungsschritte · Derivatisierung erforderlich · begrenzte Kapazität	· Basisforschung · Metabolismusuntersuchungen · ausgewählte Fragestellungen
Radiochromatographie	chromatographische (z.B. TLC, HPLC) Auftrennung der extrahierten Lipide; nachfolgend Quantifizierung der aufgetrennten Metaboliten (Scanner oder Szintillationsmeßgerät)	· Darstellung von Metabolitenprofilen · quantitativer Nachweis aller extrahierten Lipide gleichzeitig · dadurch hohe Kapazität	· Arbeiten mit radioaktivem Material · Exogenes Substrat muß zugegeben werden · Aufbereitung des biologischen Materials erforderlich	· Basisforschung · Metabolismusstudien · In vitro-Bestimmung · Pharmakatestung
RIA	Messung der Radioaktivitätsänderung infolge Hemmung der Bindung von markiertem Antigen (PG) an PG-Antikörper nach Zusatz von nicht markiertem Antigen (PG)	· hohe Empfindlichkeit · bei definierten Ausgangsbedingungen wenig aufwendig · hohe Kapazität	· nur Bestimmung von Substanzen möglich, gegen die Antikörper erzeugt werden können · potentielle Gefahr von Kreuzreaktionen und "unspezifischer" Verdrängung von markiertem Antigen durch andere Substanzen	· alle Bereiche der PG-Forschung · besonders zur Serienbestimmung geeignet, z.B. Spiegelbestimmungen und Verlaufskontrollen in der Klinik

2.5 Methansulfonanilide: chemische Struktur und entzündungshemmende Eigenschaften

Die meisten der gebräuchlichen NSE sind Säuren mit Cyclooxygenase hemmender Aktivität, entweder Carbonsäuren oder solche mit Enolstruktur.

Auf der Suche nach entzündungshemmenden Substanzen mit andersartiger Struktur und damit möglicherweise anderem Wirkungsmechanismus und daraus resultierendem abweichendem Spektrum pharmakologischer und toxikologischer Aktivitäten wurde Diflumidon (R-807) entwickelt (SWINGLE et al., 1971). Als noch stärker entzündungshemmend wirkendes Molekül erwies sich Nimesulid (R-805; SWINGLE et al., 1976; VIGDAHL und TUKEY, 1977). Diese Struktur zeigte im Vergleich mit anderen aciden NSE einen wesentlich günstigeren therapeutischen Index als Quotienten aus LD_{50}/ED_{50} im Tiermodell (SWINGLE et al., 1976).

Hauptmerkmal dieser Verbindungen ist, daß ihre Säurefunktion aus einer Sulfonanilidstruktur stammt.

1982 wurden von der Schering AG Strukturen mit entzündungshemmender Aktivität vorgestellt, die ausgehend von der Leitsubstanz Nimesulid entwickelt worden waren (SCHRÖDER, 1982 a, b; RUFER et al., 1982a; Abbildung 6).

2.5.1 Übersicht über Strukturen

Unter Beibehaltung der Mesylamino- und Phenoxygruppe des Nimesulids wurden zunächst folgende potentiell wirksame Indanderivate synthetisiert.

Ausgehend von dem im Tiermodell (Carrageenin-Ödem-Test, WINTER et al., 1962; Adjuvans-Arthritis-Test, NEWBOULD, 1963) wirkungsvollsten Indanderivat wurden an diesem Molekül folgende Strukturmodifikationen vorgenommen:

- Zur Klärung der Abhängigkeit der antiphlogistischen Wirkung vom alicyclischen Teil des Indansystems wurden das Benzol-, Xylol-, Inden- Tetralin- und Naphthalinderivat synthetisiert.

- Zur Untersuchung der Bedeutung des Brücken-O des Phenoxyrestes wurden folgende Strukturen dargestellt:

  - Austausch gegen Kohlenstoff mit den Strukturelementen CH_2, C=O, CHOH, CHOEt, C(OH)Me, $C=CH_2$
  - Austausch gegen Schwefel
  - Sulfinylderivat
  - Sulfonylderivat

- Eine weitere Modifikation stellte der Austausch der Phenoxygruppe gegen eine Methylgruppe dar.

- Phenylringaustausch gegen Cyclohexyl, Naphthyl und heterocyclische Reste (z.B. Pyridyl) wurden vorgenommen.

- Der Einfluß von Halogensubstitution am Phenylring wurde anhand von 2-,3-,4-Monochlor- oder Monofluor- sowie 2,4-Difluorphenoxyderivaten untersucht.

- Modifizierungen der Methylsulfonylaminogruppe führten u.a. zu N-Acetyl- und N-Methylderivaten und damit zum Verlust des aciden H sowie zu Fluor- bzw. Chlormethansulfonaniliden.

- Austausch der gesamten Methylsulfonylaminogruppe gegen Essigsäure- bzw. Propionsäurereste ergab klassischen Entzündungshemmern vergleichbare Verbindungen.

- Inwieweit Abwandlungen am Indanring die biologische Aktivität beeinflussen, wurde an den 1-Methyl-, 1-Oxo-, 1-Hydroxy-, 1-Oxim- und 1-Methoximderivaten untersucht.

2.5.2 Bisherige Ergebnisse zur in-vivo-Aktivität

2.5.2.1 Carrageenin-Ödem- und Adjuvans-Arthritis-Test

Die in der Übersicht 2.5.1 beschriebenen Strukturen wurden an Ratten nach oraler Gabe auf ihre antiphlogistische Wirkung untersucht. Dazu dienten der Carrageenin-Ödem-Test (WINTER et al., 1962); im Falle entzündungshemmender Aktivität in diesem Modell ferner der Adjuvans-Arthritis-Test (NEWBOULD, 1963). Als Vergleichssubstanzen dienten Indometacin und Piroxicam (SCHRÖDER et al., 1982a, b; RUFER et al., 1982a).

Die biologischen Daten der in diesen Arbeiten untersuchten Verbindungen erlaubten folgende Schlüsse:

- Essentiell für die antiphlogistische Wirkung ist die Anordnung von Phenoxy- und Mesylaminogruppe, wie sie im Molekül vorliegt. Während diese Stammsubstanz für weitere Strukturveränderungen bereits ca. 50 % der Wirkstärke des Indometacins im Adjuvans-Arthritis-Test aufwies, zeigten die Isomeren keinerlei Wirkung.

- Austausch des Indansystems mit seiner aus der Ringebene herausragenden Methylengruppe gegen zum Beispiel planare Strukturen wie das Naphthalinderivat führte ebenso

zum Wirkungsverlust wie die Einführung einer Methylgruppe oder einer Carbonsäurefunktion in die 1-Position des Indansystems.

- Nicht reversible Veränderung der Methylsulfonylaminogruppe führt zu Wirkungsabfall wie zum Beispiel beim Ersatz des NH-Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe. Nur die durch Halogensubstitution an der Methylgruppe NH-acideren Verbindungen sind ebenfalls wirksam.

- Essentiell für gute Wirkung ist das Ether-O-Atom des Phenoxyrestes, dem nur ein S-Atom praktisch äquivalent ist.

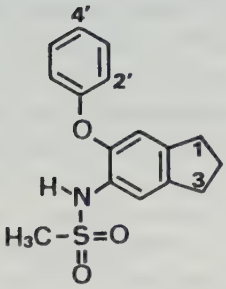
- Der Phenylring läßt sich gegen Pyridylreste, nicht aber gegen andere Ringsysteme austauschen.

- Steigerung der antiphlogistischen Wirkung wird durch die Einführung einer 1-Oxo-Gruppe in das Indansystem erreicht und damit im Adjuvans-Arthritis-Test nahezu die Wirkungsstärke des Indometacins.

- Substitution mit Fluor und/oder Chlor in 2- und/oder 4-Stellung der Phenoxygruppe führt ebenfalls zur Wirkungssteigerung; im Falle der 2,4-Difluor-Verbindung (Indan wie Indanon) wird damit die Wirkstärke von Indometacin im Adjuvans-Arthritis-Test sogar übertroffen und die des Piroxicams erreicht.

Im Carrageenin-Ödem- und Adjuvans-Arthritis-Test wirkungsvoll erwiesen sich in erster Linie Substanzen mit der allgemeinen Formel:

Abbildung 6: Strukturübersicht über einige in in-vivo-Modellen anti-inflammatorisch wirksame Methansulfonanilide.



Substituent an C-1: H_2 , H OH , O

Substituent an C-3: H_2 , H OH

2'- und 4'-Substitution: H oder F

2.5.2.2 Ulcerogenes Potential

Die in diesen in-vivo-Entzündungsmodellen erhobenen Befunde gaben Veranlassung zur genaueren Charakterisierung dieser Substanzklasse, besonders zur Untersuchung ihres ulcerogenen Potentials als der Hauptnebenwirkung von NSE.

Akuter Ulcus-Test (Ratte)

Da alle "klassischen" NSE nach einmaliger oraler Gabe an der Ratte Magenschleimhautschädigungen verursachen, ist ein akutes Modell ein entscheidender Selektionstest bei der Suche nach besser verträglichen NSE.

Im akuten Ulcus-Test an der Ratte zeigten die nicht fluorierten Methansulfonanilide ZK 31534 und ZK 34228 bis zur höchsten getesteten Dosis von 400 mg/kg p.o. keine Ulcerogenität. Die

etwa 5-10fach (dosisbezogen) stärker antiinflammatorisch wirksamen difluorierten Verbindungen ZK 37442, ZK 91182 und ZK 38997 zeigten nur in den höchsten Dosierungen $\geq$ 200 mg/kg schwache magenschleimhautschädigende Effekte, die möglicherweise auch durch mechanische Reizung der hohen applizierten Substanzmenge mitverursacht sein könnte. Die ulcerogene Dosis von Indometacin lag in diesem Test bei ca. 4 mg/kg p.o. (BÖTTCHER, 1981). (Strukturformeln s. S. 43ff)

Chronischer Ulcus-Test (Ratte)

Die 1 x tägliche Substanzgabe p.o. über 10-11 Tage wurde im chronischen Ulcus-Test an der Ratte im Falle von ZK 31534 und ZK 34228 bis zu einer Dosis von 400 mg/kg symptomlos vertragen. Im Gegensatz zu diesen beiden nichtfluorierten Methansulfonaniliden zeigten die drei fluorierten Verbindungen ZK 37442, ZK 91182 und ZK 38997 zwar auch in diesem Test eine gute Magenverträglichkeit, jedoch kam es bei Dosierungen $\geq$ 30 mg/kg zu Dünndarmulcera. ZK 37442 war dabei besser verträglich als das Indanonderivat ZK 38997, und beide Verbindungen waren dem Indometacin überlegen (BÖTTCHER, 1981).

2.5.3 Bisherige Ergebnisse zur in-vitro-Aktivität

Die ausgezeichnete gastrointestinale Verträglichkeit bei gutem antiphlogistischem Potential der untersuchten Methansulfonanilide (SCHRÖDER et al., 1982a; RUFER et al., 1982a; BÖTTCHER, 1981) veranlaßte dazu, den Wirkungsmechanismus dieser Substanzklasse in vitro zu untersuchen.

Da die systemische Verminderung des Prostaglandinspiegels nicht nur für den therapeutischen Effekt der NSE verantwortlich gemacht wird, sondern auch für ihre Nebenwirkungen, besonders

die gastrointestinalen Unverträglichkeiten (FERREIRA und VANE, 1979), wurde zunächst der Einfluß der Methansulfonanilide auf den Arachidonsäuremetabolismus anhand des Schafsamenblasen-Cyclooxygenasemodells (WALLACH und DANIELS, 1971) untersucht (RUFER et al., 1982b).

Die Prostaglandin-Synthese wurde ohne und mit Kofaktoren (Glutathion und Hydrochinon) im Vergleich zu Indometacin und dem Radikalfänger MK 447 getestet.

Indometacin hemmte die PG-Synthese deutlich, während MK 447 im System ohne Kofaktoren die Prostaglandinproduktion sogar verstärkte. Der Einfluß der Methansulfonanilide auf die PG-Synthese war verbunden mit deren Acidität.

Die inhibitorische Aktivität nahm vom ZK 91288 über das Trifluormethylindanderivat zum Nimesulid mit steigenden pKa-Werten ab (pKa 2,43; 4,65; 6,50). ZK 34228 und ZK 38997 mit pKa-Werten um 7 beeinflußten die PG-Synthese bei Konzentrationen von 10^{-3} mol/l nicht, während die Methansulfonanilide mit pKa > 9 (ZK 31534 und ZK 37442) die PG-Produktion im System ohne Kofaktoren sogar verstärkten (ähnlich MK 447).

Bei der Betrachtung der Endoperoxidzwischenstufen PGG_2 und PGH_2 im Modell ohne Kofaktoren wurden folgende Korrelationen gefunden: Wie von KUEHL et al. (1977) beschrieben, wurde auch hier durch vermehrte Bildung von PGH_2 der Quotient aus PGH_2/PGG_2 durch MK 447 vergrößert. Mit abnehmender Acidität konnte dieser Effekt auch bei den untersuchten Methansulfoniliden verstärkt festgestellt werden.

Aus diesen Befunden wurde die Vermutung abgeleitet, daß der antiphlogistischen Wirkung zumindest der schwächer sauren Verbindungen (ZK 31534 und ZK 37442) ein Radikalfängermechanismus zugrunde liegt (Rufer et al., 1982b).

2.6 Eigene Untersuchungen

Die in vivo und in vitro mit den Methansulfonaniliden erhaltenen Befunde wiesen bei guter antiphlogistischer Wirkung Unterschiede zu herkömmlichen NSE in ihrem ulcerogenen Potential und ihrer Prostaglandinsynthese-Hemmwirkung im Schafsamenblasenhomogenat-Modell auf, was vermuten ließ, daß ihnen möglicherweise ein anderer Wirkungsmechanismus zugrunde liegt.

Dabei erlangten folgende Fragen Interesse:

- Wird die nur schwache oder fehlende Cyclooxygenasehemmung auch an intakten Zellen beobachtet?

- Wird die Lipoxygenase in irgendeiner Weise beeinflußt?

- Ist eine Veränderung in der qualitativen Zusammensetzung des Metabolitenspektrums der Arachidonsäure festzustellen?

- Sind dabei Unterschiede quantitativer Art zu beobachten?

Zur Beantwortung dieser Fragen war die Etablierung zweier in-vitro-Modelle erforderlich, in denen im Vergleich mit dem Verhalten von Substanzen, deren Wirkungsmechanismus literaturbekannt ist, verschiedene charakteristische Methansulfonanilide untersucht werden sollten.

Eigene Untersuchungen begannen im Frühjahr 1981. Zu diesem Zeitpunkt lagen verschiedene Arbeiten vor, die sich mit in-vitro-Modellen zum Arachidonsäuremetabolismus von Zellen befaßten.

Um die Fähigkeit von Wirkstoffen zur Beeinflussung des inflammatorischen Geschehens zu prüfen, stand die Frage der Entzündungsrelevanz der zu untersuchenden Zellen im Vordergrund.

Sowohl Granulocyten, speziell segmentkernige neutrophile Granulocyten, die in den ersten Stunden entscheidenden Einfluß auf den Entzündungsverlauf nehmen, als auch Makrophagen, die im weiteren Verlauf eines inflammatorischen Prozesses die dominierende Rolle am Entzündungsherd spielen, wurden für die Untersuchungen ausgewählt. Als Quelle für die Granulocyten diente das jederzeit zugängliche Blut des Untersuchers, was mehrere positive Aspekte beinhaltete. Zum einen war gleichbleibende Qualität gegeben, was Reproduzierbarkeit von erhaltenen Werten und damit deren Vergleichbarkeit untereinander ermöglichte.

Zum anderen erlauben Ergebnisse von Versuchen mit humanem Zellmaterial bessere Vergleiche mit zu erwartenden Wirkungen der untersuchten Substanzen am Menschen als bei Verwendung von Zellen anderer Spezies.

Außerdem konnte durch Verwendung von humanem Versuchsmaterial der Einsatz von Versuchstieren eingeschränkt werden.

Bei den Makrophagenuntersuchungen mußte jedoch auf Versuchstiere zurückgegriffen werden, da sich eine Entnahme dieser an verschiedenen Orten im Körper residierenden Zellen aus dem menschlichen Organismus verbietet und die im peripheren Blut anzutreffenden Monocyten zu geringe Ausbeuten erbringen würden.

Um mit Zellen zu arbeiten, die möglichst gleichbleibende Eigenschaften während des Untersuchungszeitraumes aufwiesen,

wurden die Peritonealmakrophagen männlichen Mäusen des Gewichtes von 30-40 g eines Inzuchtstammes (NMRI-SPF, Schering AG) entnommen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Gebräuchliche Laborchemikalien zum Ansetzen verschiedener Lösungen und Puffer sowie Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Ferak (Berlin) in der Qualität pro analysi bezogen.

Ferner wurden folgende Substanzen verwendet:

Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
zur Granulocytenisolierung
Liquemin (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)
(= Heparin) als Anticoagulans
May-Grünwald- und Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt)
für die Färbung nach Pappenheim
Pico-Fluor 15 (Packard-Instruments, Frankfurt/M.)
für Szintillationsmessungen

3.2 Nährmedien, Puffer und Serum

Als Nährmedium wurde sowohl für die Makrophagen als auch für die Granulocyten Dulbecco's Modification of Eagle's Medium mit L-Glutamin der Firma Gibco Europe (Karlsruhe) verwendet. Diesem Medium wurde immer eine Lösung (Fa. Gibco) aus 5000 I.E. Penicillin/ml und 5000 µg Streptomycin/ml (entsprechend 40-50 I.E./ml) als Antibiotikum zugefügt.

Neben diesem im Weiteren als DMEM bezeichneten Normalmedium wurde zur Kultivierung der Peritonealmakrophagen das Normalmedium DMEM mit einem Zusatz von 1 % bzw. 10 % foetalem Kälberserum (FCS) der Firma Gibco benutzt.

Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das foetale Kälberserum vor Zugabe zu dem Medium bei 56°C 45 Minuten im Wasserbad belassen. Als Pufferlösung diente Phosphate Buffered Solution (PBS), die von der Firma Gibco bezogen wurde.

3.3 Geräte und allgemeine Arbeitsbedingungen

Die Arbeiten zum Ansetzen der Nährmedien sowie das Ansetzen der Zellkulturen fanden unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Airflow-Kabinett der Firma Ceag/Mathiessen (Geesthacht) statt. Es wurden sterile Einmalgeräte oder durch 60minütige Sterilisation in einem Sterilisationsgerät der Firma Haeraeus (Hanau) bei 180°C vorbereitete Glasgefäße, Pipettenspitzen und Pasteurpipetten verwendet.

Als Einmalgeräte aus Plastikmaterial dienten u.a. Falcon 10 ml Pipetten, Gewebekulturröhrchen (16 x 150 mm), Petrischalen (60 x 15 mm) und konische Röhrchen (50 ml; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), sowie Tissue Culture Wells (24 Löcher) der Firma Costar (Cambridge, Mass., USA).

Zur Zentrifugation wurden folgende Modelle der Firmen Beckmann (München) und Hettich (Tuttlingen) verwendet: Beckmann Modell J-6 und Hettich Rotixa.

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Lösungen wurde ein pH-Meter der Firma Knick (Berlin) benutzt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte in einem mit CO_2 begasbaren Brutschrank der Firma Haeraeus (Hanau), Modell B5060 EK/CO_2.

Die Ultrabeschallung der Zymosan-A-Suspension erfolgte mit einem Ultraschall-Desintegrator B12 der Firma Branson Sonic Power (Genf, Schweiz).

Radioaktivitätsmessungen erfolgten in dem Tri-Carb-Szintillationsmeßgerät der Firma Packard Instruments (Frankfurt/M) mit einer Meßzeit pro Probe von 2 Minuten. Die Auswertung der Radioaktivitätsverteilung auf den entwickelten Dünnschichtchromatogrammen erfolgte an einem Thin-Layer-Chromatography-Analyzer der Firma Berthold (Wildbad), der über einen Empfängerteil mit einem Recorder (W+W 1100, Basel, Schweiz) verbunden war. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte an einem Rechner der Firma Hewlett-Packard (Berlin), HP 97 S I/O Calculator mit dem Programm LB 97 S-RC 1/2.

3.4 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Proben erfolgte in einer DC-Kammer der Firma CAMAG (Berlin; Typ I in Tabelle 2) oder in der Mehrplattenkammer der Firma Desaga (Heidelberg) (Typ II in Tabelle 2).

Als Dünnschichtchromatographieplatten dienten:

A. Silica Platten F 254/366, 20 x 20 cm, der Firma Woelm, (Eschwege),

B. DC-Fertigplatten mit Konzentrierungszone Kieselgel 60 F 254, 20 x 20 cm, der Firma Merck (Darmstadt),

C. HPTLC-Fertigplatten F_{254}, 10 x 20 cm (Merck),

D. Reversed Phase Platten OPTI-UP C_{12-20} mit einer Dodecyltrichlorsilanschicht, 20 x 20 cm, der Firma Antec AG (Bennwil, Schweiz).

Die benutzten Fließmittel (Tabelle 2) waren teilweise der Literatur entnommen, teilweise waren sie in Vorversuchen den in der Literatur beschriebenen Fließmitteln als überlegen ermittelt worden. Da die Fließmittel in den beiden verschiedenen benutzten Kammertypen bei unterschiedlichen Sättigungszeiten der Fließmittel variierende Rf-Werte für die einzelnen Lipide zeigten, sind in der Tabelle 2 die als optimal ermittelten Kombinationen von Fließmittel, Kammertyp, Dünnschichtchromatographieplatte und Sättigungszeit einander zugeordnet worden.

Tabelle 2: Benutzte dünnschichtchromatographische Systeme zur Auftrennung von Eicosanoiden

System	Fließmittel	v/v	Bemerkung	DC-Platte	Kammer	Sättigung	Literatur
A	Chloroform Methanol Essigsäure Wasser	90 8 1 0,8		Woelm	I	60 Min	NUGTEREN u. HAZELHOF (1973)
B	Essigsäure-ethylester Essigsäure	99 1		Merck	II	30 Min	BONNEY et al. (1978a)
C	Acetonitril Wasser Essigsäure	40 60 1	Drei Entwickl.: 1. 8 cm 2. 12 cm 3. 16 cm Reversed Phase DC	Antec	II	---	
D	Isooctan Essigsäure-ethylester Aceton Essigsäure Wasser	25 50 5 10 50	Entwickl. mit der organischen Phase	Woelm	I	30 Min	
E	Isooctan Essigsäure-ethylester Essigsäure Wasser	25 55 10 50	Entwickl. mit der organischen Phase	Woelm	I	30 Min	SAMUELSSON und HAMBERG (1966)
F	n-Hexan Diethylether Essigsäure	40 60 1		Woelm	I	30 Min	
G	Chloroform Methanol Essigsäure Wasser	90 8 1 0,8	High-performance DC	Merck HPTLC	II	30 Min	

3.5 Stimulatoren

Als Stimulator der Peritonealmakrophagenaktivität wurde Zymosan A von Saccharomyces cerevisae von der Firma Sigma (Taufkirchen) benutzt.

Die Aktivierung der Granulocyten erfolgte mit dem Antibioticum Calcium Ionophor A 23187, dessen gemischtes Calcium-Magnesium-Salz (MG ca. 550) von der Firma Calbiochem - Behring Corp. (La Jolla, USA) bezogen wurde.

3.6 Wirkstoffe

Zur Charakterisierung im Makrophagen- und Granulocytenmodell wurden die in Tabelle 3 aufgeführten literaturbekannten Substanzen ausgewählt.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Strukturen der Methansulfonanilide, die in den in-vivo-Zellmodellen untersucht wurden.

Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen maximal 10^{-4} und 10^{-8} mol/l untersucht. Dazu war es zunächst erforderlich, eine Stammlösung mit 10^{-2} mol/l herzustellen. Die dafür benutzten Lösungsmittel sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 3: Im Makrophagen- und Granulocytenmodell untersuchte literaturbekannte Wirkstoffe

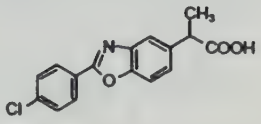
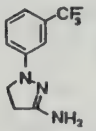
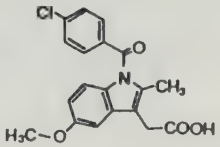
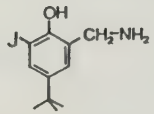
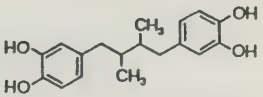
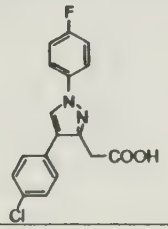
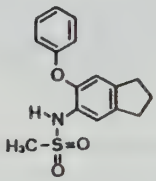
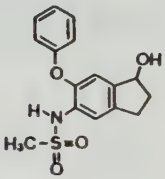
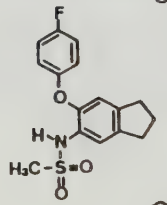
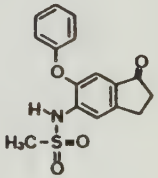
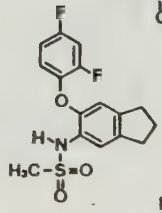
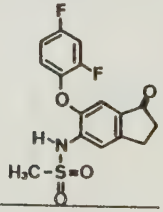
Name	Chemische Bezeichnung	Summenformel Molekulargewicht	Struktur
Benoxaprofen	2-[2-(4-Chlorphenyl)-5-benzoxazolyl]-propionsäure	$C_{16}H_{12}ClNO_3$ 301,7	
BW 755C	1-(3-Trifluormethylphenyl)-2-pyrazolin-3-amin, Hydrochlorid	$C_{10}H_{11}F_3N_3Cl$ 265,7	
ETYA (Eicosatetraynoic acid)	Eicosa-5,8,11,14-tetrainsäure	$C_{20}H_{24}O_2$ 296,4	
Indometacin	1-(p-Chlorbenzoyl-5-methoxy-2-methylindol-3-essigsäure	$C_{19}H_{16}ClNO_4$ 357,8	
MK 447	2-Aminomethyl-4-t-butyl-6-jodphenol, Hydrochlorid	$C_{11}H_{17}ClJNO$ 341,7	
NDGA (Nordihydroguaiaretic acid)	4,4'-(2,3-Dimethyltetramethylen)-dipyrocatechol	$C_{18}H_{22}O_4$ 302,4	
Pirazolac	4-(4-Chlorphenyl)-1-(4-fluorphenyl)-3-pyrazolessigsäure	$C_{17}H_{12}ClFN_2O_2$ 330,7	

Tabelle 4: Überblick über die Strukturen der untersuchten Methansulfonanilide

Name	Chemische Bezeichnung	Summenformel Molekulargewicht	Struktur
ZK 31534	N-(6-Phenoxyindan-5-yl)-methansulfonamid	$C_{16}H_{17}NO_3S$ 303,4	
ZK 32743	N-(1-Hydroxy-6-phenoxy-indan-5-yl)-methansulfonamid	$C_{16}H_{17}NO_4S$ 319,4	
ZK 33612	N-[6-(4-Fluorphenoxy)-indan-5-yl]-methansulfonamid	$C_{16}H_{16}FNO_3S$ 321,4	
ZK 34228	N-(1-Oxo-6-phenoxyindan-5-yl)-methansulfonamid	$C_{16}H_{15}NO_4S$ 317,4	
ZK 37442	N-[6-(2,4-Difluorphenoxy)-indan-5-yl]-methansulfonamid	$C_{16}H_{15}F_2NO_3S$ 339,4	
ZK 38997	N-[6-(2,4-Difluorphenoxy)-1-oxoindan-5-yl]-methansulfonamid	$C_{16}H_{13}F_2NO_4S$ 353,3	

Fortsetzung Tabelle 4

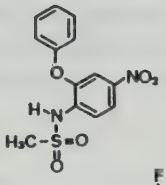
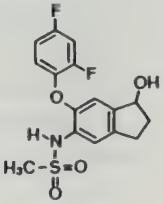
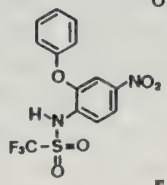
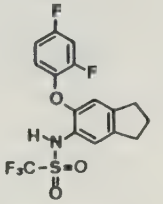
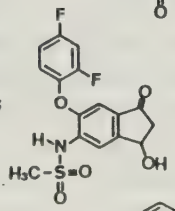
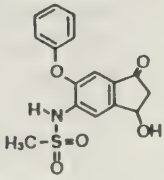
Name	Chemische Bezeichnung	Summenformel Molekulargewicht	Struktur
ZK 73705 R-805 Nimesulid	N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)-methansulfonamid	$C_{13}H_{12}N_2O_4S$ 292,3	
ZK 91182	N-[6-(2,4-Difluorphenoxy)-1-hydroxyindan-5-yl]-methansulfonamid	$C_{16}H_{15}F_2NO_4S$ 355,3	
ZK 91288	N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)-trifluormethansulfonamid	$C_{13}H_9F_3N_2O_5S$ 362,3	
ZK 91697	N-[6-(2,4-Difluorphenoxy)-indan-5-yl]-trifluormethansulfonamid	$C_{16}H_{12}F_5NO_3S$ 393,3	
ZK 98062	N-[6-(2,4-Difluorphenoxy)-1-oxo-3-hydroxyindan-5-yl]-methansulfonamid	$C_{16}H_{13}F_2NO_5S$ 369,3	
ZK 98063	N-(1-Oxo-3-hydroxy-6-phenoxyindan-5-yl)-methansulfonamid	$C_{16}H_{15}NO_5S$ 333,4	

Tabelle 5: Benutzte Lösungsmittel zum Ansetzen einer 10^{-2} molaren Wirkstofflösung

Name	0,01 mmol	Lösungsmittel
Benoxaprofen	3,02 mg	900 µl H_2O + 100 µl 0.1 N NaOH
BW 755C	2,66 mg	1000 µl H_2O
ETYA	2,96 mg	800 µl H_2O + 200 µl 0,1 N NaOH
Indometacin	3,58 mg	800 µl H_2O + 200 µl 0,1 N NaOH
MK 447	3,42 mg	950 µl H_2O + 50 µl 1 N HCl
NDGA	3,02 mg	500 µl Ethanol + 500 µl H_2O
Pirazolac	3,31 mg	800 µl H_2O + 200 µl 0,1 N NaOH
ZK 31534	3,03 mg	300 µl 0,1 N NaOH + 700 µl H_2O nach gelindem Erwärmen
ZK 32743	3,19 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 33612	3,21 mg	300 µl 0,1 N NaOH + 700 µl H_2O nach gelindem Erwärmen
ZK 34228	3,17 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 37442	3,39 mg	300 µl 0,1 N NaOH + 700 µl H_2O nach gelindem Erwärmen
ZK 38997	3,53 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 73705	2,92 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 91182	3,55 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 91288	3,62 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 91697	3,93 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 98062	3,69 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O
ZK 98063	3,33 mg	200 µl 0,1 N NaOH + 800 µl H_2O

3.7 1-^{14}C-Arachidonsäure und radioaktive Metaboliten

Die als Substrat eingesetzte radioaktive Arachidonsäure wurde ebenso wie die als Referenzsubstanzen benötigten Metaboliten der Arachidonsäure von der Firma New England Nuclear Chemicals GmbH (Dreieich) bezogen.

Folgende titriummarkierte Substanzen standen zur Verfügung:

Prostaglandin E_2, 6-Keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$, Prostaglandin D_2, 12-L-Hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraensäure, 5-D-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure, 15-L-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraensäure, Leukotrien C_4.

3.8 Extraktion von Eicosanoiden aus Kieselgelschichten

Um bereits über Kieselgel aufgetrennte Eicosanoide isoliert vorliegen zu haben (um sie z.B. einem veränderten chromatographischen System zuführen zu können), mußten sie aus der stationären Phase eluiert werden.

Als schonendes Verfahren mit einer im Vergleich zu Verfahren mit anderen Extraktionsmitteln (wie Methanol, Diethylether, oder Ethanol-Wasser-Gemische) hohen Wiederfindungsrate der Lipide (> 70 %) hatte sich folgende Methode erwiesen:

Die Kieselgelschicht wurde im Bereich des Substanzfleckes von der Glasplatte abgekratzt und in einem Schliffglas gesammelt und fein zerstoßen. Daraufhin wurden 3 ml Wasser hinzugefügt und die Suspension mit 1N Zitronensäure auf pH 3,5 angesäuert.

Nun erfolgte eine Extraktion mit 3 ml eines Gemisches aus Chloroform/Methanol (2/1; V/V) mit anschließender Zentrifugation bei 3000 rpm. Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Vor dem Eindampfen der organischen Phase bei 37°C unter Stickstoffbegasung wurde sie noch einmal mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (2/1; V/V) ausgeschüttelt.

3.9 Peritonealmakrophagenmodell

Untersuchungen an Peritonealmakrophagen erfolgten nach der von BONNEY et al. (1978a) beschriebenen Methode in teilweise abgewandelter Form.

1. Anstatt tritiummarkierter Arachidonsäure wurde die an C-1 markierte Arachidonsäure als Substrat verwendet. Durch die wesentlich stärkere Strahlungsenergie von ^{14}C gegenüber Tritium wurde die Auswertung am Radioscanner erleichtert, da das Zählrohr des Berthold TLC-Analyzers eine um den Faktor zehn höhere Zählausbeute bei ^{14}C gegenüber Tritium aufweist.

2. Um die Abweichungen weitgehend auszugleichen, die bei der Ausbringung und Behandlung von Zellkulturen in den einzelnen Gewebekulturschalen auftreten können, wurden Gewebekulturplatten mit 24 Löchern à 15 mm Durchmesser verwendet. Sie enthielten jeweils 1 ml des Probenansatzes. Davon wurden je vier identisch behandelt und vor der Extraktion zu einer Probe gepoolt.

3. Die Extraktion der Arachidonsäure und ihrer Metaboliten aus dem Kulturmedium bereitet insofern Probleme, als sich die verschiedenen Eicosanoide, die von den Makrophagen in das

umgebende Medium sezerniert werden, in ihrem Elutionsverhalten erheblich voneinander unterscheiden. So wurde das von BONNEY et al. (1978a) beschriebene Extraktionsmittelgemisch Chloroform/Methanol (2/1; V/V) mit Essigsäureethylester und mit Diethylether verglichen.

Aus auf pH 3.5 eingestelltem Kulturmedium wurde mit jeweils gleichen Mengen der drei Lösungsmittel die Wiederfindungsrate von Arachidonsäure als lipophilstes der sezernierten Eicosanoide, sowie von PGE_2 und 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ bestimmt. Dabei zeigte sich für Arachidonsäure die höchste Wiederfindungsrate beim Chloroform/Methanolgemisch. Nahezu die gesamte eingesetzte Aktivität fand sich im organischen Lösungsmittel wieder. Für PGE_2 lieferten sowohl Chloroform/Methanol als auch Essigsäureethylester Extraktionsausbeuten von > 80 %. Bei 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ erwies sich nur Essigsäureethylester als Lösungsmittel mit einer Verteilung von etwa 1:3 zwischen hydrophiler und lipophiler Phase als brauchbar.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aus drei Versuchen als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben sowie die Verteilungskoeffizienten P (P = Partition) berechnet aus den Mittelwerten als Quotient der Substanzkonzentration c in der Lipid- und der Wasserphase:

$$P = \frac{c \text{ Lipidphase}}{c \text{ Wasserphase}}$$

Aufgrund der in Tabelle 6 dargestellten Verteilungskoeffizienten für die angegebenen Lösungsmittel wurde für die Extraktion der Makrophagenüberstände Essigsäureethylester gewählt, was für zwei aufeinanderfolgende Ausschüttelungen Ausbeuten von 98 % für Arachidonsäure, 97 % für PGE_2 und 91 % für 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ bedeutet.

Tabelle 6: Extraktionsausbeuten durch gleiche Volumina Lösungsmittel für Arachidonsäure (AA), PGE_2 und 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ und Verteilungs-Koeffizienten zwischen Lipid- und Wasserphase

	AA	PGE_2	6-Keto-$PGF_{1\alpha}$
Diethylether	78 ± 9 %	61 ± 7 %	38 ± 4 %
Verteilungskoeffizient	3,5	1,6	0,5
Chloroform/Methanol	91 ± 8 %	83 ± 5 %	51 ± 6 %
Verteilungskoeffizient	10,1	4,9	1,0
Essigsäuereethylester	85 ± 6 %	84 ± 4 %	70 ± 4 %
Verteilungskoeffizient	5,7	5,2	2,3

Bei Extraktionsversuchen mit silikonisierten Glasgeräten konnte kein Unterschied in den Extraktionsausbeuten im Vergleich zu nicht silikonisiertem Glasmaterial festgestellt werden. Deshalb wurde auf die von verschiedenen Autoren durchgeführte Silikonisierung verzichtet.

4. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der extrahierten Eicosanoide wurde in verschiedenen beschriebenen Fließmitteln durchgeführt. Dabei erwies sich das von BONNEY et al. (1978a) benutzte Fließmittel Essigsäureethylester/Essigsäure (99/1; V/V) dann als optimal, wenn es in Verbindung mit den Kieselgelplatten mit Konzentrierungszone (Merck) in einer Mehrplattenkammer benutzt wurde, worin sich nach einer halbstündigen Vorsättigungszeit mehrere DC-Platten gleichzeitig in gleichem Abstand voneinander befanden. Wurden diese Bedingungen nicht eingehalten, erreichte man nur eine unzureichende Auftrennung der hydrophileren Eicosanoide voneinander.

5. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte an einem TLC-Analyzer, verbunden mit einem Vielkanalanalysator, einem Schreiber und einem Rechner. Auf diese Weise erhielt man ein genaues Bild der von dem TLC-Analyzer über einen festgelegten Zeitraum gemessenen Zerfälle, deren lokale Zuordnung auf dem Chromatogramm sowie eine quantitative Auswertung der gemessenen Peaks. Diese Methode erschien in Hinsicht auf die Genauigkeit und die Zeitdauer der Auswertung dem Abkratzen der den einzelnen Peaks entsprechenden Flächen der Kieselgelschicht mit anschliessender Aktivitätsbestimmung im Szintillationsmeßgerät als überlegen.

3.9.1 Herkunft der Peritonealmakrophagen

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Inzuchtstammes NMRI-SPF aus der Zentralen Tierzucht der Schering AG verwendet, die ein Gewicht von 30-40 g aufwiesen.

3.9.2 Isolierung der Peritonealmakrophagen

Nach dem Töten der Mäuse durch Halswirbelbruch wurden ca. 8 ml pro Maus des in Eis gekühlten Kulturmediums (DMEM + 1 % FCS, dem 20 I.E. Heparin/ml als Antikoagulans zugefügt waren) in die Peritonealhöhle gespritzt und kurz geschüttelt. Die in der Peritonealhöhle befindliche Flüssigkeit wurde möglichst quantitativ mit einer Spritze abgezogen und auf Eis in einem Tissue Tube (50 ml) gesammelt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte 10 Minuten bei 4°C und 1000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet aufgenommen in DMEM + 1 % FCS + 20 I.E. Heparin/ml.

Aus einem 1:3 mit 3 %iger Essigsäure und 0,1 %iger Trypanblaulösung verdünnten Aliquot wurde anschließend eine Zellzählung durchgeführt. Als Viabilitätskriterium galt der Trypanblauausschluß (Endkonzentration an Trypanblau 0,03 %), was eine Rate von > 93 % ergab.

Die durchschnittliche Makrophagenausbeute betrug $3,4 \times 10^6$ Makrophagen pro Maus.

Die Einstellung der erforderlichen Zellkonzentration erfolgte mit DMEM + 1 % FCS + 20 I.E. Heparin/ml auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

Die Zellsuspension wurde in Costar Tissue Culture Cluster (24 Löcher, Durchmesser 16 mm) mit 1 ml pro Loch ausgebracht. Die anschließende zweistündige Inkubation erfolgte, wie alle weiteren Inkubationen, in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO_2. Nach der Inkubation hatte sich aufgrund der Fähigkeit der Makrophagen, an dem beschichteten Plastikmaterial zu adhärieren, ein fester Zellrasen aus Makrophagen gebildet (Makrophagen-Monolayer). Durch dreimaliges Waschen des angewachsenen Zellrasens wurden nicht adhärierende Zellen sowie fast vollständig vorhandene Erythrocyten entfernt. Beim

jeweiligen Absaugen des Überstandes war darauf zu achten, daß die Zellen nur sehr kurz (maximal 5 Sekunden) von Flüssigkeit unbedeckt waren, da sich die Zellen bei längerer Antrocknungszeit innerhalb von 20 Sekunden in ihrer Morphologie verändern und die Adhärenz an das Plastikmaterial abnimmt. Bei erneuter Zugabe von PBS bzw. Kulturmedium lösen sich dadurch große Teile des Zellrasens ab.

Dies war vor allem im randnahen Bereich der Kulturlöcher zu beobachten, wo sich durch Adhäsion des Kulturmediums bzw. des PBS an die Außenwand der Flüssigkeitsmeniskus konkav ausbildet und sich dort zuerst ein Flüssigkeitsmangel und damit eine verstärkte Austrocknung bemerkbar macht.

Dem Waschvorgang schloß sich die Zugabe von je 1 ml DMEM + 10 % FCS pro Loch und eine 24stündige Inkubation an.

Nach erneutem zweimaligen Waschen mit je 1 ml PBS pro Loch dauerte die darauf folgende Inkubation 16 Stunden. Dabei enthielt das Kulturmedium das Substrat.

3.9.3 Substratlösung

Als Substrat diente 1-^{14}C-Arachidonsäure. Pro Loch wurden 2,5 µl, pro Versuchsansatz (= 4 Löcher) 10 µl der ethanolischen Arachidonsäurelösung (NEN) in 1 ml bzw. 4 ml DMEM + 1 % FCS gelöst. Bei einer spezifischen Aktivität von 52 mCi/mmol und einer Konzentration der ethanolischen Lösung von 0,29 mg 1-^{14}C-Arachidonsäure in 0,5 ml entsprechen 2,5 µl 1-^{14}C-Arachidonsäurelösung 1,45 µg bzw. 4,8 nmol Arachidonsäure sowie einer Radioaktivität von 0,25 µCi; 10 µl der 1-^{14}C-Arachidonsäurelösung entsprechen 5,8 µg bzw. 19,2 nmol Arachidonsäure sowie einer Aktivität von 1,0 µCi.

Zur Aktivitätsmessung wurden 0,5 ml der fertigen Substratlösung abgenommen, mit 10 ml Szintillationslösung versetzt und die Aktivität in einem Packard Tri-Carb-Szintillationsmeßgerät gemessen.

3.9.4 Messung der Aufnahmequote des Substrates in die Zellen

Im Anschluß an die 16-stündige Inkubation mit 1-^{14}C-Arachidonsäure enthaltendem Kulturmedium wurde der Überstand aus den Löchern abgesaugt und mit der Waschflüssigkeit (Waschen: zweimal mit je 1 ml PBS pro Loch) gesammelt. 0,5 ml davon wurden zur Aktivitätsmessung abgenommen, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationsmeßgerät gemessen. Der Vergleich der Aktivität des Kulturmediums vor der Inkubation mit der Aktivität des Kulturmediums plus Waschlösung nach der Inkubation ergab eine durchschnittliche Aufnahmequote der 1-^{14}C-Arachidonsäure durch die Makrophagen nach 16 Stunden von 71 ± 7 % (n = 5).

3.9.5 Wirkstofflösungen

0,01 mmol der zu testenden Wirkstoffe wurden in je 1 ml Lösungsmittel gelöst. Diese 10^{-2} molaren Lösungen wurden mit DMEM 1:50 weiterverdünnt (entsprechend 2 x 10^{-4} mol/l). Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:10 bis zu 2 x 10^{-8} molaren Lösungen. Pro Loch wurden 0,5 ml der Wirkstofflösungen bzw. Lösungsmittelkontrollen zugegeben. Daher betrug die auf die Makrophagen einwirkende Endkonzentration bei 1 ml Reaktionsvolumen 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} bzw. 10^{-8} mol/l.

3.9.6 Stimulussuspension

Zur Stimulierung der Phagocytose und der damit einhergehenden metabolischen sowie sekretorischen Aktivitätssteigerung der Makrophagen wurde Zymosan A aus Saccharomyces cerevisiae benutzt. Um eine möglichst fein verteilte Suspension zu erhalten, wurden 200 µg Zymosan A pro Loch abgewogen, in PBS kurz aufgekocht und anschließend bei 3000 rpm zentrifugiert. Dieser Wasch- und Suspendierungsvorgang wurde noch zweimal wiederholt und das Zymosan A Pellet in 0,5 ml DMEM pro Loch suspendiert und kurz vor Versuchsbeginn ultrabeschallt.

3.9.7 Testansatz

Vier Löcher bildeten einen Versuchsansatz. Pro Loch wurden nacheinander 0,5 ml Wirkstofflösung bzw. Lösungsmittelkontrolle und 0,5 ml der Zymosansuspension zugegeben und kurz gemischt. Die anschließende Inkubationsdauer betrug 4 Stunden.

3.9.8 Extraktion

Zum Ende der vierstündigen Inkubationszeit wurden die Überstände aus den vier Löchern pro Ansatz mit einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenglas gepoolt und, um eventuell überführte Makrophagen abzutrennen, bei 2500 rpm 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Mit 140 µl einer 2 molaren Zitronensäurelösung wurde der Überstand auf pH 3,5 eingestellt und die Lipide zweimal mit je 4 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungsmittelextrakte wurden zweimal mit je 2 ml H_2O gewaschen. Das Einen-

gen des Lösungsmittels erfolgte unter Stickstoffbegasung in einem auf 37°C erwärmtem Wasserbad. An der Reagenzglaswand anhaftende Lipide wurden mit 2 ml Diethylether abgespült und das Lösungsmittel wie zuvor verdampft.

3.9.9 Dünnschichtchromatographische Trennung

Die Proben wurden mit 30 µl eines Gemisches von Chloroform/Methanol im Verhältnis 2/1 (V/V) aufgenommen und mit Kapillaren punktförmig auf die Konzentrierungszone der Dünnschichtplatten (Silica Platten Merck 60 F 254 mit Konzentrierungszone 20 x 20 cm) aufgetragen. Als Dünnschichtchromatographiekammer diente eine Mehrplattenkammer (DESAGA).

Die Sättigungsdauer mit dem Fließmittel Essigsäureethylester/Eisessig (99/1; V/V) betrug 30 Minuten. Zur Erreichung von möglichst identischen Rf-Werten wurden mehrere Platten gleichzeitig in gleichem Abstand voneinander entwickelt. Die Entwicklungsdauer für die 17 cm Laufstrecke betrug ca. 65 Minuten.

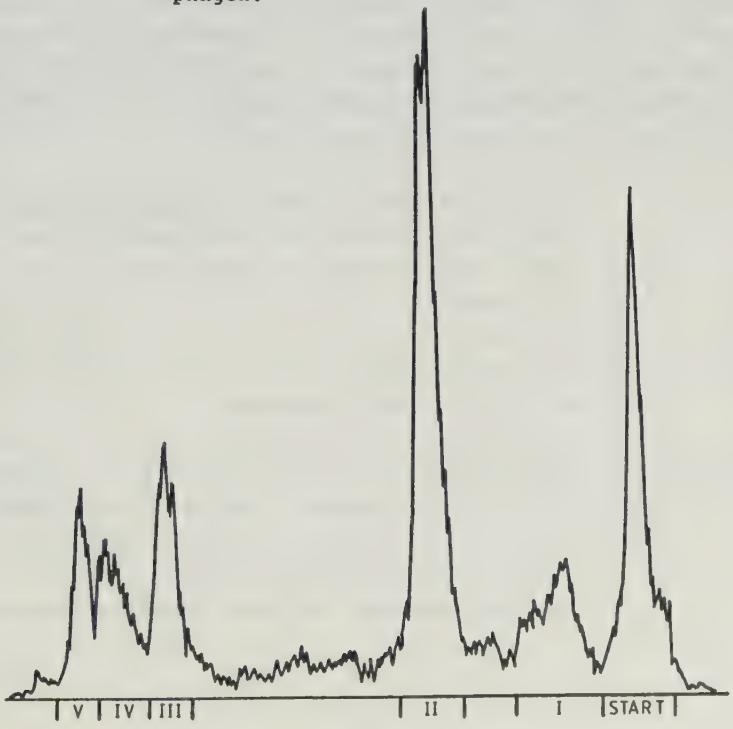
3.9.10 Detektion

Die Detektion der 1-^{14}C-Arachidonsäure und ihrer Metaboliten mit radioaktivem C-Atom erfolgte am TLC-Analyzer Berthold LB 2820. Jede Bahn auf der Dünnschichtplatte wurde 10 Minuten entwickelt.

3.9.11 Identifizierung der Metaboliten der Peritonealmakrophagenstimulation

Die Abbildung 7 zeigt das Bild des Radioscans einer Dünnschichtchromatographieplatte, auf der die extrahierten Lipide des Überstandes einer mit Zymosan A inkubierten Peritonealmakrophagenkultur (nach Präinkubation mit radioaktiver Arachidonsäure) entwickelt wurden. Die chromatographischen Bedingungen entsprachen denen des Systems B aus Tabelle 2.

Abbildung 7: Radioscan der dünnschichtchromatographisch (System B) aufgetrennten Lipide von mit Zymosan A stimulierten murinen Peritonealmakrophagen.



Die errechneten Rf-Werte sind in Tabelle 7 für die einzelnen Peaks mit der Entwicklung in System B angegeben.

Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte mit den Mitteln der Dünnschichtchromatographie. Dazu wurden die den einzelnen Peaks der Entwicklung in Essigsäureethylester/Essigsäure entsprechenden Flächen der Kieselgelschicht von der Glasplatte abgekratzt und die Lipide mit der in Kapitel 3.8 beschriebenen Methode aus der Kieselgelschicht eluiert. Diese wurden mit radioaktiv markierten Reinsubstanzen der Firma NEN als Vergleichen in verschiedenen dünnschichtchromatographischen Systemen entwickelt.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die in den einzelnen Systemen (beschrieben in Tabelle 2) errechneten Rf-Werte. Daraus ergibt sich eine eindeutige Zuordnung bei Peak I, II, III und V zu den Vergleichen. Unklar bleibt die Identifizierung des Startpeaks und von Peak IV.

Peak I: In allen Systemen stimmten die Rf-Werte des Peaks I aus System B mit dem Vergleich von 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$, dem biologischen Abbauprodukt von PGI_2, überein.

Peak II: Hier ergaben sich jeweils gleiche Rf-Werte mit der PGE_2-Vergleichssubstanz.

Peak III: 5-HETE zeigte die Rf-Werte, die die Substanz ergibt, die in System B den Peak III bildete.

Peak V: Dieser Peak entspricht in seinem chromatographischen Verhalten dem Arachidonsäurevergleich.

Tabelle 7: Rf-Werte der extrahierten radioaktiven Lipide der Peritonealmakrophagenstimulation durch Zymosan A im Vergleich zu den Rf-Werten von Vergleichssubstanzen in verschiedenen dünnschichtchromatographischen Systemen

Peak des Systems B	System B	System A	System D	System F	System G
Startpeak	0	0	0	0	0
Peak I	0,14	0,07	0,19	0	0
Peak II	0,36	0,30	0,41	0	0,31
Peak III	0,78	0,58	0,75	0,42	0,48
Peak IV	0,88	0,66	0,83/0,86	0,52/0,59	0,60
Peak V	0,94	0,81	0,91	0,90	0,71
Vergleichssubstanzen					
LTC_4	0	0	0	0	0
6-Keto-$PGF_{1\alpha}$	0,14	0,07	0,19	0	0
PGE_2	0,36	0,30	0,41	0	0,31
TxB_2	0,43	0,30	0,48	0	
LTB_4	0,71	0,35	0,70	0,11	
5-HETE	0,78	0,58	0,75	0,42	0,48
12-HETE	0,87	0,66	0,82	0,59	0,71
15-HETE	0,88	0,68	0,86	0,61	0,71
Arachidonsäure	0,94	0,81	0,91	0,91	0,71

Startpeak: Der Startpeak in System B besteht möglicherweise aus mehreren Substanzen, nämlich aus in den Zellüberstand abgegebenen Phospholipiden, in denen radioaktiv markierte Arachidonsäure als Fettsäureanteil enthalten ist. Phospholipidvergleiche sind so hydrophil, daß sie am Start zurückbleiben. Außerdem aus Leukotrien C_4 und D_4, die im Überstand von stimulierten Makrophagenkulturen gefunden wurden. Sie sind ebenfalls so hydrophil, daß sie mit den angegebenen Fließmitteln nicht vom Startfleck gelöst und aufgetrennt werden können. Daher wird eine Auswertung des Aktivitätsanteiles im Startpeak unter dem Einfluß von Wirkstoffen keine Aussage über die Wirksamkeit des Stoffes in Hinblick auf eine Hemmung der Lipoxygenase oder Cyclooxygenase erlauben.

Peak IV: Die Auftrennung des Extraktes aus der Kieselgelschicht des Peaks IV ergab in anderen Systemen (D und F) keinen eindeutigen Flecken, sondern mehrere nahe beieinander liegende Peaks. Da es sich daher bei diesem Peak vermutlich um ein Gemisch von mehreren Substanzen handelt, die sehr ähnliche lipophile Eigenschaften aufweisen wie 5-, 12- und 15-HETE und hydrophiler sind als die Arachidonsäure, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um Metaboliten handelt, die ebenfalls hydroxylierte Eicosanoide sind. Alle bekannten Cyclooxygenaseprodukte weisen hydrophilere Eigenschaften auf. Verschiedene - später unter "Ergebnisse und Diskussion" beschriebene - Daten der Versuche mit Lipoxygenasehemmstoffen lassen vermuten, daß es

sich hierbei um Metaboliten handelt, die über den Lipoxygenaseweg entstanden sind.

Auch dieser Peak ist also aus den dargestellten Gründen für eine quantitative Auswertung ungeeignet.

3.9.12 Quantitative Verteilung der extrahierten Metaboliten der Makrophagenstimulation

Bei der Stimulierung der murinen Peritonealmakrophagen mit Zymosan A ergaben sich unter den angegebenen Versuchs- und Extraktionsbedingungen die in nachstehender Tabelle angegebene Verteilung der mit dem TLC-Analyzer ermittelten Aktivitätsmenge. Die Angaben erfolgen für jeden Peak in Prozent der gemessenen Gesamtaktivität der auf der Dünnschichtchromatographieplatte in System B aufgetrennten Probe. Sie sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus fünf verschiedenen Versuchen mit Standardabweichung.

Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der nach Zymosanstimulation von Peritonealmakrophagen sezernierten Eicosanoide

	Start	Peak I 6-K-$PGF_{1\alpha}$	Peak II PGE_2	Peak III 5-HETE	Peak IV	Peak V Arachidonsäure
% der Gesamtaktivität	18,9	6,9	30,0	14,5	6,3	5,6
Standardabweichung	± 5,9	± 1,4	± 3,8	± 1,4	± 2,1	± 2,2

3.10 Granulocytenmodell

Um die Beeinflussung der Regulation des Arachidonsäuremetabolismus von Granulocyten durch Wirkstoffe zu untersuchen, wurde auf Arbeiten von BORGEAT und SAMUELSSON zurückgegriffen, die Untersuchungen an glycogeninduzierten Peritonealgranulocyten aus Kaninchen und an menschlichen Granulocyten aus dem peripheren Blut vorgenommen haben (BORGEAT und SAMUELSSON, 1979a, b, c; BORGEAT et al, 1976). Dabei wurden mittels RP-HPLC und GC-MS die Metaboliten identifiziert, die bei einer gleichzeitigen Inkubation von Granulocyten mit Calcium Ionophor A 23187 und exogener Arachidonsäure entstehen.

Um die Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus von menschlichen Granulocyten durch verschiedene Substanzen beobachten zu können, wurden in Vorversuchen die Bedingungen für ein solches Untersuchungsmodell festgelegt. Unterschiede zu der Methode von BORGEAT und SAMUELSSON bestanden besonders in der Isolierung der Zellen, der Extraktion und der analytischen Auftrennung und Auswertung.

1. Zur Isolierung der Zellen aus menschlichem peripheren Blut wurde die Methode nach HJORTH et al. (1981) über einen diskontinuierlichen Gradienten mit Percoll benutzt, wodurch eine schnelle und saubere Abtrennung der Granulocyten von anderen Blutzellen erreicht wurde.

2. Die Extraktion der Lipide aus den Zellüberständen erfolgte mit Chloroform/Methanol (2/1; V/V), was eine höhere Extraktionsausbeute erbrachte als die Extraktion mit Diethylether (s. Tab. 6).

3. Die Auftrennung und anschließende Auswertung der extrahierten Lipide erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Detektion der Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner.

3.10.1 Granulocytenherkunft

Granulocyten wurden aus Eigenblut gewonnen. Es wurde jeweils durch Venenpunktion vor Versuchsbeginn entnommen. Heparin diente als Antikoagulans (50-100 I.E./ml Blut).

3.10.2 Isolierung der Granulocyten

Zur Isolierung der Granulocyten aus menschlichem Blut wurde dieses über einen diskontinuierlichen Gradienten getrennt (modifizierte Methode nach HJORTH et al., 1981). Dazu wurden zwei verschieden dichte Lösungen von mit Polyvinylpyrrolidon beschichteten Silicapartikeln (Percoll) benutzt.

Das im Handel erhältliche Percoll hat eine Dichte von 1,130 ± 0,005 g/ml, einen pH von 8,9 ± 0,3 bei 20°C und eine Osmolarität von 20 mOs/kg H_2O (Lit.: Pharmacia Fine Chemicals, 1980).

Zur Trennung von Blutzellen muß Percoll physiologischen Verhältnissen angeglichen werden. Während HJORTH et al. (1981) in ihrer Methode den pH-Wert des Percoll von ca. 9 unverändert beließen, wurden hier zur Angleichung des pH-Wertes und des osmotischen Wertes an die des Blutes den beiden für den diskontinuierlichen Gradienten benutzten Lösungen 15 % PBS und 8,5 % 1,5 molare NaCl-Lösung zugesetzt, so daß ein pH-Wert von 7,9 bis 8,1 und eine Osmolarität von etwa 300 mOs/kg H_2O erreicht wurde.

In Vorversuchen wurden die benötigten Dichten für die beiden zu überschichtenden Percoll-Lösungen ermittelt. Diese Werte variieren von Spender zu Spender. Bei den beschriebenen Versuchen wurde ausschließlich das Blut eines Spenders benutzt, so daß sich für Lösung I eine Dichte von ρ = 1,097 g/ml und für Lösung II ein Wert von ρ = 1,078 g/ml als optimal herausstellte.

Die Menge Percoll, die benötigt wird, diese Dichten herzustellen, läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$Vo = V \frac{\rho - 0{,}1 \times \rho_{10} - 0{,}9}{\rho o - 1}$$

Vo =	Volumen Percoll (aus der Flasche)	ml
V =	Volumen der fertigen Lösung	ml
ρ =	gewünschte Dichte der fertigen Lösung	g/ml
ρo =	Dichte des Percoll (aus der Flasche; bei den beschriebenen Versuchen immer ρ = 1,130 g/ml)	g/ml
ρ_{10}=	Dichte der 1,5 molaren NaCl-Lösung (ρ = 1,058 g/ml)	g/ml

Daraus ergibt sich für Lösung I:

$$Vo = 100 \frac{1{,}097 - 0{,}1 \times 1{,}058 - 0{,}9}{1{,}130 - 1} \text{ ml}$$

$$= 70 \text{ ml}$$

Für Lösung II:

$$Vo = 100 \frac{1{,}078 - 0{,}1 \times 1{,}058 - 0{,}9}{1{,}130 - 1} \text{ ml}$$

$$= 55{,}2 \text{ ml}$$

Nach Zugabe der 1,5 molaren NaCl-Lösung und des PBS muß mit H_2O bis 100 ml aufgefüllt werden.

Daraus ergeben sich folgende Zusammensetzungen für Lösung I und Lösung II:

	Lösung I	Lösung II
Percoll	70 %	55,2 %
PBS	15 %	15 %
1,5 M NaCl	8,5 %	8,5 %
H_2O	6,5 %	21,3 %
	100 %	100 %

Zur Herstellung des Gradienten wurden 4 ml der Lösung II in ein Tissue Culture Tube 16 x 125 mm gefüllt und vorsichtig mit 4 ml der Lösung I aus einer Spritze mit dicker Kanüle unterschichtet. Die oberste Schicht bildeten 4 ml des unverdünnten heparinisierten Blutes (Abbildung 8a).

Abbildung 8: Trennung von Blutzellen über einen diskontinuierlichen Gradienten mit Percoll. Vor (a) und nach (b) der Zentrifugation.

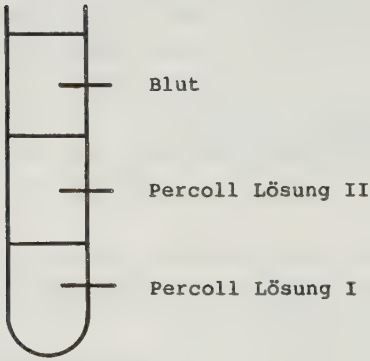


Abbildung 8a

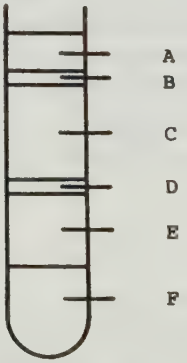


Abbildung 8b

Trennung in A: Serum mit Thrombocyten
B: Lymphocyten mit vereinzelten Monocyten
C: Percoll
D: Granulocyten
E: Percoll
F: Erythrocyten

Zentrifugation:

Die Zentrifugation erfolgte 25 Minuten bei 1600 rpm und 20°C in der Beckmann-Zentrifuge und ergab eine Trennung der Blutzellen, wie sie in Abbildung 8b dargestellt ist.

Die Identifizierung der Blut-Zellen und Thrombocyten erfolgte durch mikroskopische Betrachtung von Ausstrichen, die nach Poolen und Zentrifugation der entsprechenden Banden A, B und D aus mehreren Röhrchen gewonnen worden waren. Die Anfärbung der Ausstriche erfolgte nach der Methode von PAPPENHEIM.

Waschen und Aufarbeiten der Zellen:

Der Überstand aus Serum mit Thrombocyten, die Lymphocyten mit vereinzelten Monocyten sowie das Percoll (A bis C aus Abbildung 8b) wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Granulocytenbande mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem Tissue Culture Tube (50 ml) gesammelt. Die Aufarbeitung von 100 ml Blut (entsprechend 25 Proben) bildete einen Arbeitsgang.

Mit PBS erfolgte eine Verdünnung (1+1).
Die anschließende Zentrifugation dauerte 15 Minuten bei gleichen Bedingungen wie zuvor.

Der Überstand wurde verworfen, die Granulocyten, die mit wenigen Erythrocyten verunreinigt waren, bildeten das Pellet. Die Zellen aus allen Ansätzen wurden mit PBS in einem Tissue Culture Tube (50 ml) vereinigt und auf 50 ml aufgefüllt. Die anschließende Zentrifugationsdauer bei 900 rpm und 20°C betrug 10 Minuten. Die Aufnahme des Granulocytenpellets er-

folgte in 10 ml DMEM, woran sich eine Zellzählung aus einem 1:3 mit 3 %iger Essigsäure und 0,1 %iger Trypanblaulösung (Endkonzentration an Trypanblau 0,03 %) verdünnten Aliquot anschloß. Der Trypanblauausschluß als Maß für die Viabilität der Zellen betrug mehr als 95 %.

Granulocytenausbeute

Leukocytenzählungen aus dem Spenderblut ergaben durchschnittlich 4100 Leukocyten/µl Blut. Im Differentialblutbild des Spenders bildeten die Granulocyten (Neutrophile Stabkernige, Neutrophile Segmentkernige, Eosinophile, Basophile) einen Anteil von 56 %, Monocyten und Lymphocyten zusammen 44 %.

Das ließ eine Granulocytenanzahl von 2,3 x 10^6 Zellen/ml Blut erwarten. Die tatsächliche Ausbeute nach der Trennung über Percoll mit anschließendem Waschen der Zellen lag bei 1,1 x 10^6 Zellen/ml Blut, was einer Ausbeute von 48 % entspricht.

Der überwiegende Anteil (ca. 87 %) wird von den Neutrophilen Segmentkernigen Granulocyten gebildet.

3.10.3 Versuchsansätze

Die Versuchsansätze setzten sich aus je einem Milliliter

1. Wirkstofflösung bzw. Lösungsmittelkontrolle
2. Zellsuspension
3. Substratlösung und
4. Stimuluslösung

zusammen, die nacheinander in Petrischalen (Durchmesser 6 cm) pipettiert und vor der Inkubation gemischt wurden.

3.10.3.1 Wirkstofflösungen

0,01 mmol der zu testenden Wirkstoffe wurden in je 1 ml Lösungsmittel gelöst. Diese 10^{-2} molaren Lösungen wurden mit DMEM 1:25 weiterverdünnt (entsprechend 4 x 10^{-4} mol/l). Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:10 bis zu 4 x 10^{-7} molaren Lösungen.

Die Endkonzentration betrug bei 4 ml Reaktionsvolumen 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} bzw. 10^{-7} mol/l.

3.10.3.2 Zellsuspension

Die isolierten Granulocyten wurden mit DMEM auf eine Konzentration von 3 x 10^{6} Granulocyten/ml/Versuchsansatz eingestellt.

3.10.3.3 Substratlösung

Als Substrat diente 1-^{14}C-Arachidonsäure.

Pro Versuchsansatz wurden 2 µl der ethanolischen Arachidonsäurelösung (NEN) in 1 ml DMEM gelöst. Bei einer spezifischen Aktivität von 52 mCi/mmol und einer Konzentration der ethanolischen Lösung von 0,29 mg 1-^{14}C-Arachidonsäure in 0,5 ml entsprechen 2 µl der 1-^{14}C-Arachidonsäurelösung 1,16 µg bzw. 3,8 nmol Arachidonsäure und einer Radioaktivität von 0,2 µCi/ml.

3.10.3.4 Stimuluslösung

Zur Stimulierung der Arachidonsäuremetabolisierung durch die Granulocyten diente das Calcium Ionophor A 23187. Eine 10^{-3} molare Vorratslösung wurde hergestellt aus 2,5 mg des Calcium-Magnesium-Salzes (MG ca. 550), das in 1 ml H_2O, 2 ml Ethanol und 1,6 ml DMSO gelöst wurde. Diese Lösung war bei -20°C über mehrere Wochen hinweg ohne erkennbaren Aktivitätsverlust haltbar.

Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Verdünnung der 10^{-3} molaren Lösung mit DMEM auf 4 x 10^{-6} mol/l (entsprechend 4 µl der 10^{-3} molaren Lösung in 1 ml DMEM). Die Endkonzentration betrug bei 4 ml Reaktionsvolumen 10^{-6} mol/l.

3.10.4 Inkubation

Die Inkubation erfolgte 10 Minuten in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO_2.

3.10.5 Extraktion

Zum Ende der Inkubation wurden die Überstände mit einer Pasteurpipette in Reagenzgläser pipettiert und durch eine 5minütige Zentrifugation bei 2500 rpm (Raumtemperatur) von mitüberführten Granulocyten getrennt.

140 µl einer 2 molaren Zitronensäurelösung dienten zum Ansäuern der Überstände, deren pH-Wert damit auf 3,5 gebracht wurde.

Die Extraktion erfolgte zweimal mit einer Mischung aus Chloroform/Methanol im Verhältnis 2/1 (V/V) in Glasschliffreagenzgläsern durch Schütteln. Die vereinigten organischen Lösungsmittelextrakte wurden anschließend zur Neutralisierung des pH-Wertes mit einer Mischung aus Methanol/H_2O im Verhältnis 2/1 (V/V) gewaschen. Das Einengen der organischen Lösungsmittel erfolgte unter Stickstoffbegasung in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad.

An der Reagenzglaswand anhaftende Lipide wurden mit 2 ml Diethylether abgespült und das Lösungsmittel wie zuvor verdampft.

3.10.6 Dünnschichtchromatographische Trennung

Die Proben wurden mit 30 µl eines Gemisches von Chloroform/Methanol im Verhältnis 2/1 (V/V) aufgenommen und mit Kapillaren punktförmig auf Dünnschichtplatten (Woelm Silica Platten 20 x 20 cm) aufgetragen. Als Dünnschichtkammer diente die Doppeltrogkammer von CAMAG, die zuvor eine Stunde mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol/Wasser/Essigsäure (45/4/0,4/0,5; V/V) gesättigt wurde. Die Entwicklung für 17 cm Laufstrecke von je zwei sich gegenüberstehenden Platten dauerte etwa 85 Minuten.

3.10.7 Detektion

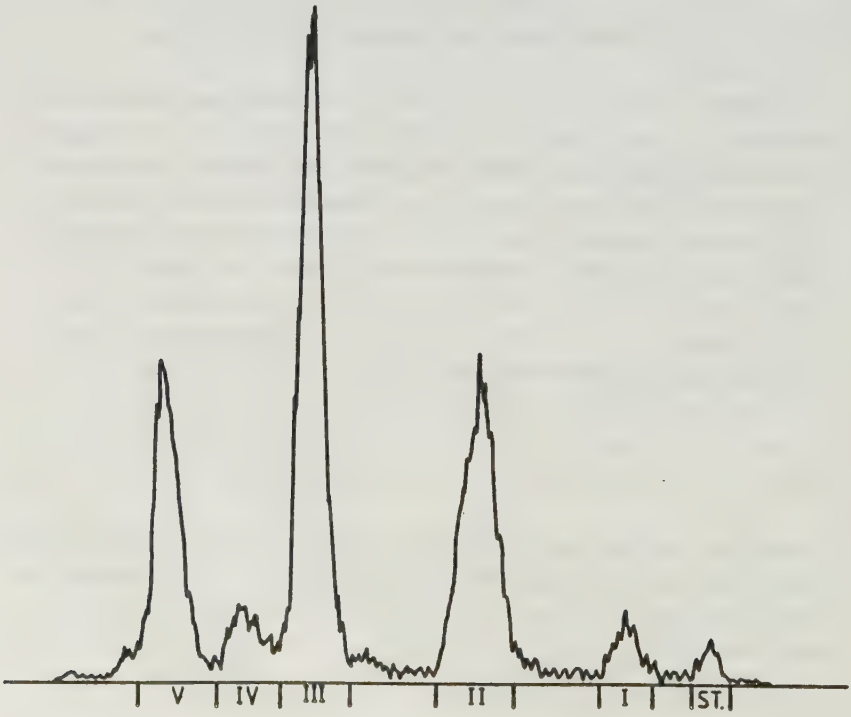
Die Detektion der 1-^{14}C-Arachidonsäure und ihrer Metaboliten mit radioaktivem C-Atom erfolgte am TLC-Analyzer Berthold LB 2820. Jede Bahn auf der Dünnschichtplatte wurde 5 Minuten entwickelt.

3.10.8 Identifizierung der Metaboliten der Granulocytenstimulation

3.10.8.1 Dünnschichtchromatographie

Ein typischer Radioscan einer Dünnschichtchromatographieplatte, auf der die extrahierten Lipide einer Reaktion von A 23187 stimulierten Granulocyten mit Arachidonsäure unter den in Kapitel 3.4 angegebenen Bedingungen für System A entwickelt wurde, wird in Abbildung 9 gezeigt:

Abbildung 9: Radioscan der dünnschichtchromatographisch (System A) aufgetrennten Lipide von mit Ionophor A 23187 stimulierten Granulocyten.



In diesem dünnschichtchromatographischen System ergaben sich für die einzelnen Peaks die in Tabelle 9 für System A dargestellten Rf-Werte.

Zur weiteren Identifizierung der Peaks wurden diese nach der in Kapitel 3.8 beschriebenen Methode aus der Kieselgelschicht eluiert und in verschiedenen in Kapitel 3.4 angegebenen Systemen mit radioaktiv markierten Reinsubstanzen verglichen. Daraus ergaben sich die in Tabelle 9 dargestellten Übereinstimmungen. (Unmarkiertes LTB_4 wurde zur Verfügung gestellt von Dr. M.A. BRAY, Ciba-Geigy, Basel/Schweiz. Es war hergestellt und gereinigt nach der von FORD-HUTCHINSON et al., 1980a, beschriebenen Methode. Die Identifizierung auf der DC-Platte erfolgte durch Jod-Dämpfe.)

Aus Tabelle 9 ergeben sich Übereinstimmungen der ermittelten Rf-Werte in allen vier verschiedenen dünnschichtchromatographischen Systemen für folgende Peaks:

Peak II: Der Metabolit, der im chromatographischen System A den Peak II bildete, wies in allen Systemen die gleiche Laufstrecke auf wie die Leukotrien B_4-Vergleichssubstanz.

Peak III: Bei Peak III gilt diese Beobachtung für die 5-HETE-Vergleichssubstanz.

Peak IV: Der Peak IV des Systems A zeigte in allen benutzten Fließmitteln gleiche Fließeigenschaften wie 12-HETE und 15-HETE, die sich mit den beschriebenen Methoden nicht eindeutig voneinander trennen ließen.

Tabelle 9: Rf-Werte der extrahierten radioaktiven Lipide der Granulocytenstimulation durch Calcium Ionophor A23187 in Gegenüberstellung zu den Rf-Werten von Vergleichssubstanzen in verschiedenen dünnschichtchromatographischen Systemen

Peak des Systems A	System A	System C	System E	System F
Startpeak	0	0,94	0	0
Peak I	0,13	0,84	0,28	0
Peak II	0,35	0,47	0,62	0,10
Peak III	0,58	0,26	0,78	0,42
Peak IV	0,68	0,13	0,89	0,61
Peak V	0,81	0,11	0,93	0,91
Vergleichssubstanzen				
LTB_4	0,35	0,47	0,62	0,11
5-HETE	0,58	0,26	0,78	0,42
12-HETE	0,66	0,12	0,89	0,59
15-HETE	0,68	0,13	0,89	0,61
Arachidonsäure	0,81	0,11	0,93	0,91

Peak V: Hier ergaben sich gleiche Rf-Werte wie bei dem Arachidonsäurevergleich.

Startpeak und Peak I, die zusammen nur 7 % der gesamten extrahierten radioaktiven Metabolitenmenge ausmachten, ließen sich keiner der als Vergleich benutzten Substanzen (im System A auch Prostaglandin E_2, 6-Keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ und Thromboxan B_2) eindeutig zuordnen.

3.10.8.2 Bioassay

Peak II und Peak III des Systems A, die in allen untersuchten Fließmitteln mit Leukotrien B_4 bzw. mit 5-HETE identische Eigenschaften zeigten, wurden auch in einem Bioassay von Dr. M.A. BRAY untersucht. Bei dem von BRAY et al. (1980) beschriebenen Assay wird die Fähigkeit einer Substanz gemessen, Peritonealgranulocyten von Ratten aggregieren zu lassen. LTB_4 zeigt von den bisher bekannten Metaboliten der Arachidonsäure diese Eigenschaft am stärksten (BRAY et al., 1981). Bei diesem Test wird eine Granulocytensuspension mit einer verdünnten Lösung der zu testenden Substanz versetzt und die Veränderung der Durchlässigkeit in einem Aggregometer gemessen.

Halbmaximale Aggregation wurde mit einer Lösung mit etwa 0,23 ng/ml extrahiertem Metaboliten aus Peak II erreicht, was der zu beobachtenden Wirkung von reinem LTB_4 in diesem Assay entspricht (0,17 ng/ml; FORD-HUTCHINSON et al., 1980a).

Diejenigen Substanz, die in System A den Peak III bildete und mit 5-HETE co-chromatographierte, wurde bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml in diesem Aggregationstest unter-

sucht, wobei sich keinerlei Wirkung zeigte, was auch den Beobachtungen von FORD-HUTCHINSON et al. (1980b) für die Monohydroxysäuren entspricht.

3.10.9 Quantitative Verteilung der extrahierten Metaboliten der Granulocytenstimulation

Bei der Stimulierung der Granulocyten mit Calcium Ionophor A 23187 ergab sich unter den angegebenen Versuchs- und Extraktionsbedingungen die in Tabelle 10 angegebene Verteilung der mit dem TLC-Analyzer ermittelten Aktivitätsmenge. Die Angaben erfolgen für jeden Peak in Prozent der gemessenen Gesamtaktivität der auf der Dünnschichtchromatographieplatte in System A aufgetrennten Probe. Sie sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus fünf verschiedenen Versuchen mit Standardabweichung.

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der nach Calcium Ionophor A 23187-Stimulation von Granulocyten sezernierten Eicosanoide

	Start	Peak I	Peak II LTB_4	Peak III 5-HETE	Peak IV 12-/15-HETE	Peak V Arachidonsäure
% der Gesamtaktivität	2,8	4,6	27,9	40,0	4,7	15,2
Standardabweichung	± 0,6	± 0,7	± 2,0	± 2,4	± 0,8	± 1,9

3.11 Auswertung

Die von dem TLC-Analyzer am Zählrohr in einer vorgegebenen Zeitspanne (10 Minuten bei Makrophagen, 5 Minuten bei Granulocyten) ermittelten Zerfälle der auf der Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennten radioaktiven Lipide wurden im Vielkanalanalysator gespeichert und über den HP-Rechner zugeordnet zu den einzelnen Peaks ausgegeben.

Die so ermittelte Anzahl der Zerfälle der Metaboliten einer jeden Wirkstoffkonzentration ($Counts_{Wirkstoff}$) wurde mit den Werten verglichen, die bei der stimulierten Kontrollreaktion (mit Zymosan A bzw. Calcium Ionophor A 23187, ohne Wirkstoff) für die verschiedenen Metaboliten gemessen wurden ($Counts_{Kontrolle}$).

Aus der Formel

$$\% \text{ Hemmung} = 100\ \% - \frac{Counts_{Wirkstoff}}{Counts_{Kontrolle}} \times 100\ \%$$

ergibt sich die prozentuale Hemmung der Metabolitenproduktion bei der eingesetzten Wirkstoffkonzentration im Vergleich zur Kontrollreaktion.

Aus diesen Werten von drei bis sechs Experimenten für jede Wirkstoffkonzentration wurde mit einem Rechner (IBM, Schering AG) für jeden Metaboliten eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, aus der graphisch die IC_{50}-Werte ermittelt wurden (BRAY und GORDON, 1978).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Peritonealmakrophagenmodell: Nachweis der Angriffspunkte der "Standardsubstanzen" im Vergleich zu Methansulfonaniliden

Um die Anwendbarkeit des Makrophagenmodells kennenzulernen, wurden zunächst Substanzen eingesetzt und untersucht, deren Einfluß auf den Arachidonsäuremetabolismus bereits von anderen Autoren beschrieben wurde. Diese Ergebnisse wurden mit Daten aus Versuchen mit Methansulfonaniliden verglichen.

Da Makrophagen, wie bereits beschrieben, Arachidonsäure sowohl über den Cyclooxygenasweg (PGE_2, 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$) als auch über den Lipoxygenaseweg (HETE) oxidativ umsetzen, erlauben die durchgeführten Versuche Aussagen über den Angriffspunkt von Wirkstoffen an allen relevanten Mechanismen des Arachidonsäurestoffwechsels.

4.1.1 "Standardsubstanzen"

4.1.1.1 Hemmstoffe des Enzyms Cyclooxygenase

Der Einfluß von Wirkstoffen auf die Metabolisierung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase läßt sich in diesem Modell durch die Beeinflussung der PGE_2-Snythese bzw. -Freisetzung dokumentieren (siehe Abbildung 7).

Dieser Metabolit ist mit einem Anteil von ca. 30 % der aus dem Überstand extrahierten Gesamtaktivität das Hauptprodukt der zymosaninduzierten Arachidonsäureumsetzung.

Indometacin:

Zahlreiche Untersuchungen weisen Indometacin als potenten Hemmstoff der Cyclooxygenase aus. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden für die IC_{50}-Werte Unterschiede festgestellt, aus denen eine Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen abzuleiten ist: Sowohl Speziesabhängigkeiten in Bezug auf die Peritonealmakrophagen (z.B. Maus, Meerschweinchen) als auch die zur Stimulation verwendeten Agenzien (Zymosan A, Ionophor A 23187, TPA, FMLP) beeinflussen offenbar die Syntheseleistung und somit die Ergebnisse für die PGE_2-Hemmung. Gravierende Unterschiede zeigen sich auch beim Vergleich der Resultate, die mit ^{14}C-Arachidonat bzw. mit Radioimmunoassays erzielt werden.

Beim Einsatz von Zymosan A kommen verschiedene Autoren unabhängig von der analytischen Methode zu IC_{50}-Werten im Bereich von 10^{-8} mol/l. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte Indometacin noch bei einer Konzentration von 10^{-8} mol/l eine etwa 20%ige Hemmwirkung auf die Bildung von PGE_2. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde ein IC_{50}-Wert von $3{,}2 \times 10^{-8}$ mol/l ermittelt (Abbildung 10).

Dieser Wert korreliert gut mit Ergebnissen von BONNEY et al. von 1978 (b), die bei der Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen mit Zymosan für die Prostaglandinbildungshemmung durch Indometacin einen IC_{50}-Wert von 4×10^{-8} mol/l angeben.

1983 wurde von der gleichen Arbeitsgruppe (HUMES et al.) bei verändertem Lipidextraktionsverfahren mit 1×10^{-8} mol/l ein ähnlicher Wert für 50%ige Inhibition der PGE_2-Bildung veröffentlicht.

Auch BRAY und GORDON (1978) erhielten diesen Wert. Sie verwendeten zymosanstimulierte Peritonealmakrophagen von Meerschwein-

chen, deren PGE_2-Syntheseleistung mit einem Radioimmunoassay bestimmt wurde.

Die Arbeitsgruppe um BRUNE (1981) stellte eine Variation des Mausperitonealmakrophagensystems vor, in dem der Tumorpromotor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) als stimulierendes Agens eingesetzt wurde. Die Analytik erfolgte auch hier mit Hilfe eines Radioimmunoassays. Dabei wurde für Indometacin ein IC_{50}-Wert von $1{,}7 \times 10^{-9}$ mol/l gefunden. Dieser Wert liegt damit etwa in einem um den Faktor 10 geringeren Konzentrationsbereich als die anderen zitierten Ergebnisse. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde bei einer späteren Versuchsreihe (BRUNE, 1984) mit einer Konzentration von 10^{-8} mol/l Indometacin etwa 20%ige Hemmung, mit 10^{-7} mol/l etwa 90%ige Hemmung der PGE_2-Synthese erreicht, was einen IC_{50}-Wert zwischen 10^{-7} und 10^{-8} mol/l bedeutet.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb einer Arbeitsgruppe, sowie die in Tabelle 11 zusammengestellten IC_{50}-Werte für Indometacin bei Mikrosomenpräparationen verdeutlichen die Schwierigkeiten beim Vergleich der IC_{50}-Werte und ihrer Bewertung.

Verwendet man Prostaglandinsynthetasen zur Testung der inhibitorischen Aktivität von NSE kommt man selbst bei den gleichen Mikrosomenpräparationen zu Unterschieden um den Faktor $> 10^2$.

Tabelle 11 veranschaulicht, daß die Sensibilität von Untersuchungen mit Mikrosomenpräparationen aus verschiedenen Geweben in Bezug auf die Hemmung der Prostaglandinbildung deutlich geringer ist als die von Makrophagentests. Insgesamt sind die in den Samenblasenpräparationen ermittelten IC_{50}-Werte höher als die in Makrophagenmodellen nachgewiesenen Werte. Daraus muß geschlossen werden, daß ein Vergleich inhibitorischer Konzentra-

tionswerte verschiedener Wirkstoffe nur zulässig ist, wenn identische Untersuchungsbedingungen zur Anwendung kamen. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich die Forderung, daß beim Vergleich der Resultate aus unterschiedlichen Systemen zwar gleiche Grössenordnungen in Bezug auf die Potenz ermittelt werden können, ein zuverlässiger Vergleich aber nur durch interne Kontrolle möglich ist, d.h. daß eine Differenzierung bei geringen Aktivitätsunterschieden nur möglich ist, wenn die zu vergleichenden Substanzen im gleichen Versuch getestet werden.

Als Hemmstoffe der Cyclooxygenase zeigt Indometacin im Bereich der IC_{50} für PGE_2 nahezu keinen Effekt auf die Bildung von Lipoxygenaseprodukten, gemessen als 5-HETE. Mit 20%iger Inhibition bei 10^{-7} mol/l liegt die 5-HETE-Hemmung damit in derselben Größenordnung wie sie HUMES et al. (1983) für die LTC_4-Bildung festgestellt haben (14 %) (Tabelle 16a).

Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von Indometacin, Pirazolac, Benoxaprofen (↓: IC_{50}-Werte).

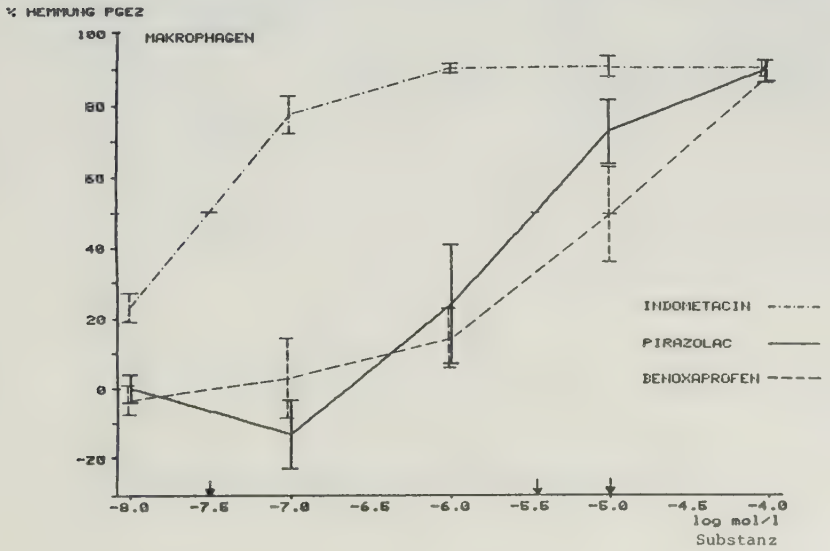


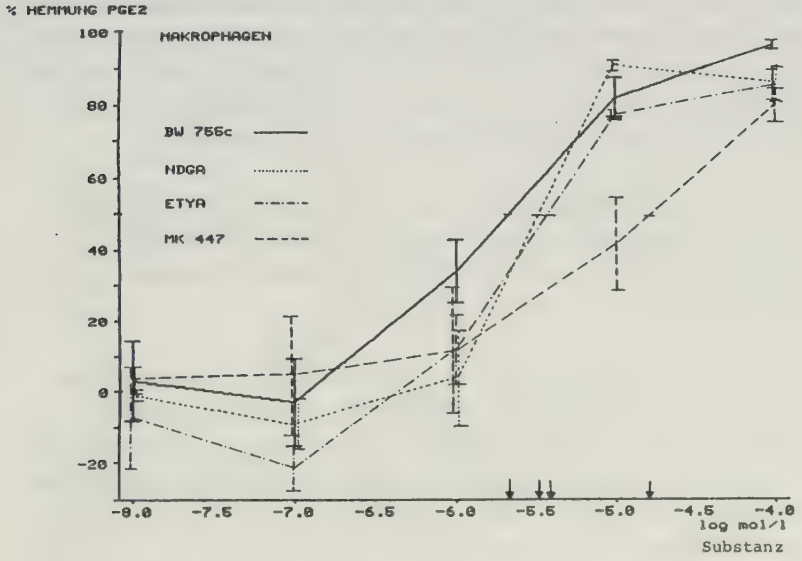
Tabelle 11: Hemmung der Prostaglandinbiosynthese in vitro durch Indometacin (IC_{50}-Werte) (nach GRYGLEWSKI, 1978).

Autor		Enzymherkunft	IC_{50}-Werte µmol/l
SMITH and LANDS	(1971)	Schafsamenblasenmikrosomen	10,0
HAM et al.	(1972)	"	0,45
RAZ et al.	(1973)	"	2,0
YOUNG et al.	(1974)	"	0,35
KU and WASVARY	(1975)	"	6,5
GAUT et al.	(1975)	"	0,5
TAKEGUCHI and SIH	(1972)	Rindersamenblasenmikrosomen	2,0
TOMLINSON et al.	(1972)	"	7,0
FLOWER et al.	(1973)	"	38,0
BURSTEIN et al.	(1973)	"	0,8
COLLIER	(1974)	"	1,0
HO and ESTERMAN	(1974)	"	0,5
GRYGLEWSKI	(1974)	"	0,1
HORODNIAK et al.	(1974)	"	1,4
DEBY et al.	(1975)	"	21,0

Tabelle 12: IC_{50}-werte für die Hemmung der PGE_2- und 5-HETE-Bildung bei Makrophagen sowie der 5-HETE-Bildung bei Granulocyten unter dem Einfluß von "Standardsubstanzen".

	Makrophagen		Granulocyten
	PGE_2	5-HETE	5-HETE
Indometacin	$3{,}2 \times 10^{-8}$	---	---
Pirazolac	$3{,}5 \times 10^{-6}$	---	---
Benoxaprofen	$1{,}0 \times 10^{-5}$	---	---
BW 755C	$2{,}0 \times 10^{-6}$	$2{,}2 \times 10^{-6}$	$2{,}0 \times 10^{-5}$
ETYA	$4{,}0 \times 10^{-6}$	$1{,}0 \times 10^{-5}$	$1{,}0 \times 10^{-5}$
NDGA	$3{,}2 \times 10^{-6}$	$7{,}1 \times 10^{-6}$	$5{,}0 \times 10^{-7}$
MK 447	$1{,}6 \times 10^{-5}$	---	---

Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von BW 755C, NDGA, ETYA und MK 447 (↓: IC_{50}-Werte).



Pirazolac

Das Pyrazolessigsäurederivat Pirazolac weist mit 3,5 x 10^{-6} mol/l (IC_{50}) ein im Vergleich zu anderen NSE (Diclofenac, Ketoprofen, Flurbiprofen) mittleres PGE_2-Hemmpotential auf, das bei 10^{-4} mol/l einen Wert von 90 % erreicht (Abbildung 10).

Ebenso wie Indometacin zeigt auch Pirazolac keine Hemmwirkung auf die Lipoxygenase und ist daher als reiner Cyclooxygenasehemmstoff anzusehen (Tabelle 17a).

4.1.1.2 Hemmstoffe von Cyclooxygenase und Lipoxygenase

BW 755C

HIGGS et al. (1979) demonstrierten an Pferdethrombocytenpräparationen den Einfluß von BW 755C auf den Arachidonsäurestoffwechsel. Diese Substanz zeigte eine dosisabhängige Hemmung sowohl von Cyclooxygenase (IC_{50} : 2,4 x 10^{-6} mol/l) als auch von Lipoxygenase (IC_{50} : 5,7 x 10^{-6} mol/l). Sie hemmt also beide Enzyme in Konzentrationen der gleichen Größenordnung.

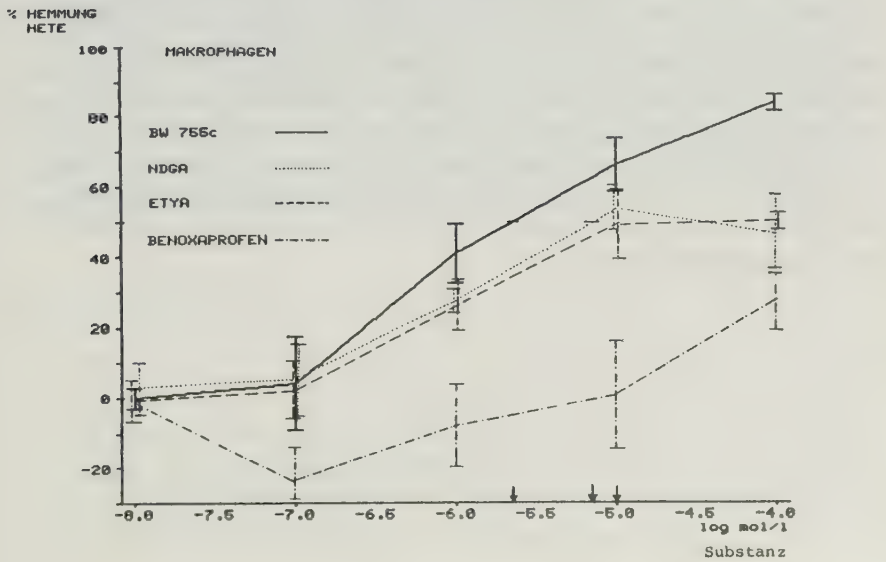
Ähnliche Resultate wurden auch bei eigenen Untersuchungen an murinen Peritonealmakrophagen erzielt. 50%ige Hemmung der PGE_2-Bildung ließ sich aus der Dosis-Wirkungs-Kurve mit 2,0 x 10^{-6} mol/l berechnen (Abbildung 11).

Zusätzlich zu dieser konzentrationsabhängigen Cyclooxygenaseinhibition hemmt BW 755C die Lipoxygenase in der gleichen Größenordnung (IC_{50} für 5-HETE: 2,2 x 10^{-6} mol/l). BW 755C erwies sich damit als der potenteste der untersuchten Wirkstoffe zur Beeinflussung der Lipoxygenaseaktivität bei murinen Peritonealmakrophagen (Abbildung 12).

Auch bei dieser Substanz ist die Korrelation der Werte mit den Ergebnissen von HUMES et al. (1983) gegeben: 3 x 10^{-6} mol/l für 50%ige PGE_2-Hemmung und 5 x 10^{-6} mol/l für LTC_4.

HUMPHREY et al. (1981) ermittelten als IC_{50} für die Cyclooxygenasehemmung durch BW 755C 5 x 10^{-6} mol/l (zymosanstimulierte murine Makrophagen; PGE_2-Nachweis: Radioimmunoassay). Abweichend von den anderen zitierten Ergebnissen liegt der IC_{50}-Wert für die Lipoxygenase jedoch zehnfach höher (5 x 10^{-5} mol/l). Diese Resultate sind nur bedingt mit den o.g. vergleichbar, da die quantitative Leukotrienbestimmung in einem Bioassay erfolgte (SRS-Nachweis: Meerschweinchen-Bioassay).

Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der 5-HETE-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von BW 755C, NDGA, ETYA, Benoxaprofen (↓: IC_{50}-Werte).



NDGA

Besonders als Lipoxygenasehemmstoff bei Granulocyten weist das Antioxidans NDGA eine starke Potenz auf (siehe Kapitel 4.2.1.2).

In diesem Makrophagenmodell zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen 10^{-5} und 10^{-7} mol/l für die Hemmung der 5-HETE-Bildung (Abbildung 12).

Die Cyclooxygenase erfährt durch NDGA etwa 90%ige Hemmung bei einer Konzentration von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l, während bei zehnfach niedrigerer Konzentration kein Effekt mehr zu beobachten ist (Abbildung 11).

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen von HUMES et al. (1983) (ebenfalls mit zymosanstimulierten Makrophagen) zeigt identische IC_{50}-Werte (3 x 10^{-6} mol/l für PGE_2 bzw. 7 x 10^{-6} mol/l für LTC_4 bzw. 5-HETE). Bei sonst übereinstimmendem Kurvenverlauf ist die Lipoxygenasehemmung bei einer Substanzkonzentration von 10^{-5} mol/l allerdings unterschiedlich. Während HUMES et al. keinerlei LTC_4-Produktion bei dieser Konzentration feststellen konnten, beträgt die 5-HETE-Synthese bei einer NDGA-Konzentration von 10^{-5} mol/l weniger als 50 % im Vergleich zur Kontrolle.

ETYA

Das Substratanaloge der Arachidonsäure, die 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure, zeigte ebenso wie BW 755C und NDGA ein inhibitorisches Potential sowohl gegenüber der Cyclooxygenase als auch der Lipoxygenase.

Die Metabolisierung der Arachidonsäure zu PGE_2 war dosisabhängig zwischen 10^{-4} und 10^{-7} mol/l gehemmt mit einem IC_{50}-Wert von $4,0 \times 10^{-6}$ mol/l (Abbildung 11).

Ebenso wie bei NDGA wurde auch durch ETYA die Bildung von 5-HETE im Bereich zwischen 10^{-5} und 10^{-7} mol/l konzentrationsabhängig behindert. Wiederum konnte mit 10^{-4} mol/l keine weitere Verstärkung der Hemmwirkung erreicht werden: Die bei 1×10^{-5} mol/l erreichte halbmaximale Inhibition blieb auch bei dieser höchsten Konzentration erhalten (Abbildung 12).

Auffallend war die durch ETYA verursachte Stimulierung der Abgabe freier Arachidonsäure an das Medium. Im Dosisbereich zwischen 10^{-4} mol/l (177% mehr Arachidonsäure als beim Zymosanvergleich) und 10^{-8} mol/l wurde dieser Effekt mit abnehmender ETYA-Konzentration ebenfalls geringer (Tabelle 19a).

Dieses Resultat kann so interpretiert werden, daß die eingesetzte ETYA auch in den Austausch Arachidonsäure "frei" - Arachidonsäure "lipidgebunden" eingeschleust wird. Dafür spricht, daß bei den Maximalkonzentrationen (10^{-4} mol/l) nicht nur die inhibitorische Aktivität dieses Pseudosubstrates am ausgeprägtesten ist, sondern auch die Verdrängung von Arachidonsäure durch ETYA aus den Phospholipidbindungen.

Benoxaprofen

Für Benoxaprofen wurde eine Hemmwirkung auf Leukocytenlipoxygenase nachgewiesen (WALKER und DAWSON, 1979). In Übereinstimmung mit anderen Autoren konnte ein schwacher Effekt auf die 5-Lipoxygenase muriner Peritonealmakrophagen beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/l dieses Wirkstoffes war eine etwa 30%ige Hemmung nachweisbar (Abbildung 12). Darüber hinaus erwies sich Benoxaprofen als relativ schwacher Inhibitor der PGE_2-Bildung (IC_{50} : 1,0 x 10^{-5} mol/l) (Abbildung 10).
Zu den gleichen Ergebnissen kommen HUMES et al. in ihrer bereits zitierten Arbeit von 1983 (IC_{50}-PGE_2 : 8 x 10^{-6} mol/l) sowie BRUNE et al. (1981) (1 x 10^{-5} mol/l).

Weitere Untersuchungen von BRUNE et al. im Jahre 1984 mit Calcium Ionophor A 23187 stimulierten Peritonealmakrophagen ergaben für Benoxaprofen ein ähnliches PGE_2-Hemmpotential, bei 10^{-4} mol/l des Wirkstoffes sogar einen stimulierenden Effekt auf die LTC_4-Produktion.

1982 wiesen AHNFELT-RØNNE und ARRIGONI-MARTELLI diesen Effekt auch bei thrombinbehandelten Kaninchenthrombocyten nach, deren Cyclooxygenaseaktivität mit 2,9 x 10^{-5} mol/l Benoxaprofen halbmaximal zu hemmen war, während die 12-Lipoxygenaseaktivität bis 10^{-4} mol/l nicht in diesem Maße eingeschränkt werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die für Benoxaprofen nachgewiesene Leukocytenmigrationshemmung (MEACOCK und KITCHEN, 1979) nicht in Zusammenhang mit verminderter Produktion von chemotaktischen Faktoren durch Makrophagen- oder Thrombocytenlipoxygenase stehen. MEACOCK und KITCHEN sehen es auf Grund der Resultate ihrer Untersuchungen als wahrscheinlicher an, daß die Leukocytenmigrationshemmung durch direkten Einfluß von Benoxaprofen auf die Zellen bewirkt wird als durch die Beeinträchtigung der Bildung chemotaktischer Faktoren.

Diese Interpretation steht nicht im Einklang mit eigenen Resultaten: Im Makrophagenmodell läßt sich eine Beeinflussung der Leukotriensynthese und - freisetzung nachweisen, und aus den Ergebnissen beim Einsatz von Benoxaprofen im Granulocytenversuch (siehe unten) läßt sich auch ein Effekt auf lipoxygenaseabhängige Reaktionen belegen.

4.1.1.3 Radikalfänger

MK 447

Das Phenolderivat MK 447 hat die Eigenschaft, die bei der Umwandlung von PGG_2 zu PGH_2 entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, vermutlich ·OH, abzufangen (KUEHL et al., 1977 und 1979). Damit ist es in der Lage, die Inaktivierung verschiedener Enzyme der Arachidonsäurekaskade durch dieses Sauerstoffradikal zu verhindern (KUEHL und EGAN, 1980).

Bei Untersuchungen mit verschiedenen Samenblasenmikrosomenpräparationen (Schaf: KUEHL et al, 1977; Rind: PAYNE et al., 1982) ließ sich daher ein stimulierender Effekt von MK 447 sowohl auf die Umwandlung von PGG_2 zu PGH_2 als auch auf die Bildung von PGE_2 ermitteln.

Bei Makrophagen konnte eine geringere Bildung von PGE_2 und PGI_2 (6-Keto-$PGF_{1\alpha}$) nachgewiesen werden: Bei einer MK 447 Konzentration von 10^{-4} mol/l war etwa 80 % weniger PGE_2 nachzuweisen und aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ließ sich ein IC_{50}-Wert von $1{,}6 \times 10^{-5}$ mol/l feststellen. Dieses zu dem stimulierenden Effekt auf die mikrosomale Prostaglandinsynthetase im Widerspruch stehende Ergebnis wurde auch von HUMES et al. (1977) an murinen Peritonealmakrophagen gefunden (Abbildung 11).

Diese Autoren schließen aus den unterschiedlichen Ergebnissen, daß das Sauerstoffradikal möglicherweise an den Vorgängen bei der Deacylierung der Phospholipide und damit der Bereitstellung freier Arachidonsäure beteiligt ist: Wäre es durch die Wirkung eines Radikalfängers dazu nicht mehr in der Lage, würde sich das bei intakten Zellen durch verminderte Metabolitenkonzentration bemerkbar machen. Da bei den Untersuchungsmodellen mit Enzympräparationen das Substrat in Form von freier Arachidonsäure zugesetzt wird, kann sich dieser Effekt dabei nicht zeigen. Träfe dieser Sachverhalt, wie er für die Radikalfänger Promethazin und Kaliumjodid von HUMES et al. vermutet wurde, auch für MK 447 zu, müßte die Konzentration der Lipoxygenaseprodukte ebenfalls verringert sein. Diese Beobachtung konnte in den hier durchgeführten Versuchen mit Makrophagen nicht gemacht werden. Ein Einfluß dieser Substanz auf die Bildung von 5-HETE konnte bis zu der höchsten Konzentration von 10^{-4} mol/l nicht festgestellt werden. Dies gilt auch für die Menge an durch die Makrophagen in den Überstand abgegebener Arachidonsäure: Ihre Konzentration war zwischen 10^{-4} und 10^{-8} mol/l nahezu konstant. Es ist daher anzunehmen, daß MK 447 bei zymosanstimulierten murinen Peritonealmakrophagen einen vergleichsweise schwachen hemmenden Effekt auf die Prostaglandinsythese hat (Tabelle 22a).

4.1.2 Methansulfonanilide: Charakterisierung im Makrophagenmodell und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

4.1.2.1 Nimesulid (ZK 73705)

Diese antiinflammatorisch gut wirksame Modellsubstanz für die Synthese von weiteren Methansulfonaniliden, speziell von Indanderivaten, zeigte im Enzymmodell eine mit Phenylbutazon vergleichbare Prostaglandinsynthesehemmung (IC_{50} Vergleich: Nimesulid 2,5 x 10^{-5} mol/l, Phenylbutazon 1 x 10^{-5} mol/l) (VIGDAHL und TUKEY, 1977).

Im Makrophagentest ließ sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der PGE_2-Bildung zwischen 10^{-4} und 10^{-7} mol/l feststellen. Daraus ergab sich ein IC_{50}-Wert von 2,8 x 10^{-6} mol/l (Abbildung 13).
Die Bildung von 5-HETE wurde in geringem Maße (35 %) bei der höchsten Konzentration von 10^{-4} mol/l unterdrückt, während ein Einfluß auf die Arachidonsäurekonzentration nicht festzustellen war (Tabelle 29a).

Welche Rolle der Nitrosubstitution im Nimesulid in Zusammenhang mit Redoxreaktionen im Arachidonat-System zufällt, ist nicht bekannt. Jedoch kommt diesem System im Vergleich zu den Indanen eine Sonderstellung zu.

4.1.2.2 Indanderivat (ZK 31534)

Austausch der Nitrogruppe des Nimesulids gegen ein Indansystem bei ZK 31534 ergab einen Wirkungsverlust. ZK 31534 hatte nur 1/10 der Aktivität im Vergleich zu Nimesulid. 60%ige Hemmung der PGE_2-Bildung wurde durch 10^{-4} mol/l der Substanz erreicht; die Wirkung verminderte sich dosisabhängig. Daraus ergab sich ein IC_{50}-Wert von 3,2 x 10^{-5} mol/l (Abbildung 14). Zusätzlich zu

dieser schwachen Hemmung der PGE_2-Bildung war auch eine geringere 5-HETE-Produktion zu verzeichnen. Eine Konzentration von 10^{-4} mol/l dieses Wirkstoffes erbrachte 50%ige Hemmung, und auch dieser Effekt verminderte sich dosisabhängig. Die Konzentration an freier Arachidonsäure im Überstand wurde durch ZK 31534 nicht beeinflußt (Tabelle 23a).

Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 73705 und ZK 91288 (↓: IC_{50}-Werte).

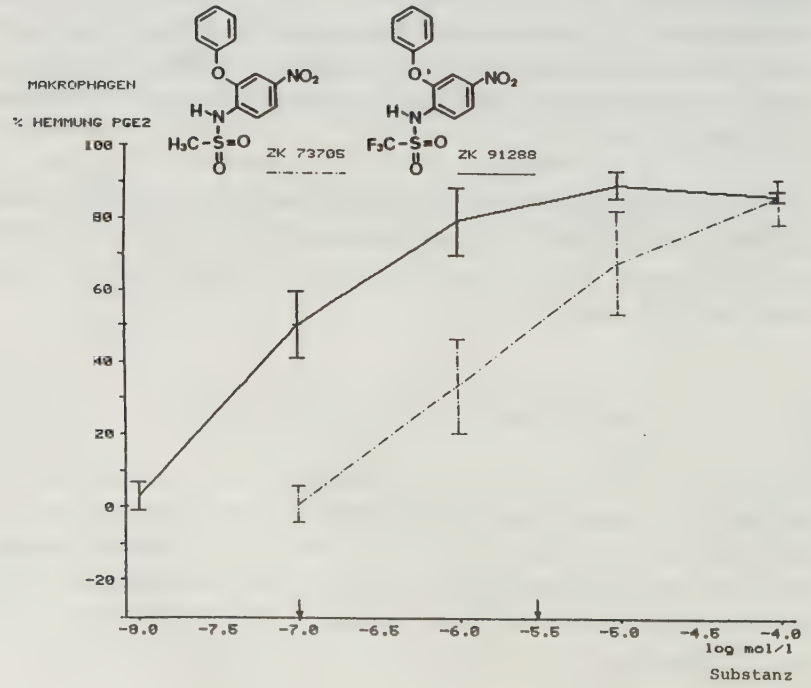
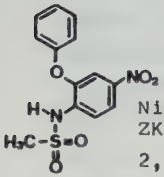
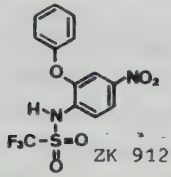


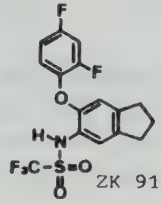
Tabelle 13: IC_{50}-Werte für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von Methansulfonaniliden (mol/l).



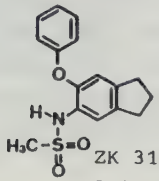
Nimesulid
ZK 73705
$2{,}8 \times 10^{-6}$



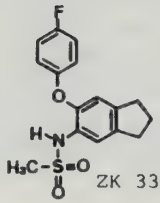
ZK 91288
$1{,}0 \times 10^{-7}$



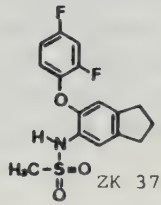
ZK 91697
$6{,}3 \times 10^{-7}$



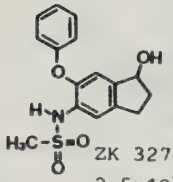
ZK 31534
$3{,}2 \times 10^{-5}$



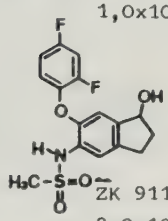
ZK 33612
$2{,}8 \times 10^{-5}$



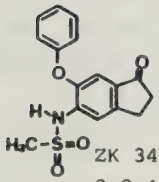
ZK 37442
$1{,}0 \times 10^{-5}$



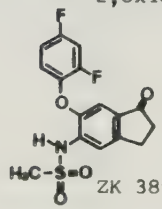
ZK 32743
$2{,}5 \times 10^{-5}$



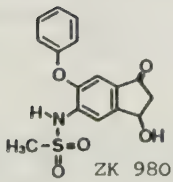
ZK 91182
$2{,}0 \times 10^{-5}$



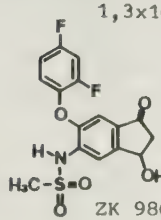
ZK 34228
$2{,}8 \times 10^{-6}$



ZK 38997
$1{,}3 \times 10^{-6}$



ZK 98063
$1{,}4 \times 10^{-5}$

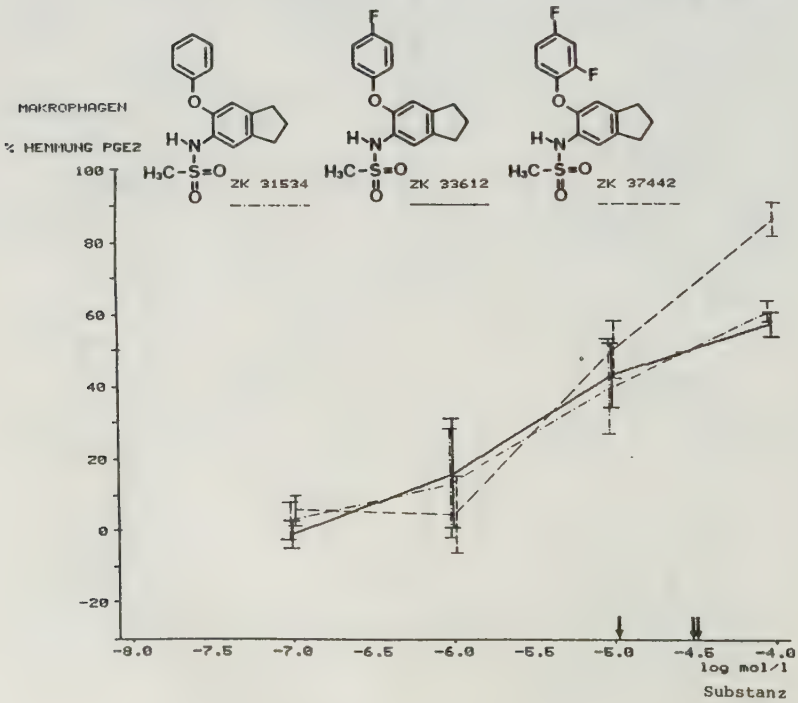


ZK 98062
$8{,}9 \times 10^{-6}$

4.1.2.3 4-Fluorphenoxyindanderivat (ZK 33612)

Einführung eines Fluoratoms in die 4-Stellung des Phenoxysubstituenten wie bei ZK 33612 erbrachte keine wesentliche Veränderung des PGE_2-Hemmpotentials im Vergleich zum nichtfluorierten ZK 31534. Mit 2,8 x 10^{-5} mol/l liegt dieser IC_{50}-Wert in der gleichen Größenordnung wie derjenige des nichtfluorierten Indans (Abbildung 14).

Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 31534, ZK 33612, ZK 37442 (↓: IC_{50}-Werte).



Die bei ZK 31534 festgestellte Hemmung der 5-HETE-Synthese trat bei ZK 33612 nicht auf (Tabelle 24a).

Bei 10^{-4} mol/l war zusätzlich ein bemerkenswerter Anstieg der 5-HETE- und Arachidonsäurekonzentration im Überstand festzustellen (220 % bzw. 400 %). Diese Ergebnisse sollten allerdings nicht überbewertet werden, da bei den durchgeführten Viabilitätsuntersuchungen (Trypanblauausschluß nach vierstündiger Inkubation mit dem Wirkstoff) bei dieser höchsten Wirkstoffkonzentration vermehrt Zellschädigungen festgestellt wurden (ca. 35 % der Zellen). Dadurch kann es bei Zerstörung von Membranstrukturen zu einer erhöhten Arachidonsäurefreisetzung kommen, die teilweise von der im Cytosol gelöst vorliegenden Lipoxygenase zu Hydroxysäuren metabolisiert wird.

4.1.2.4 2,4-Difluorphenoxyindanderivat (ZK 37442)

Im Vergleich zum nichtfluorierten ZK 31534 sowie zum Monofluorderivat ZK 33612 zeigt das 2,4-Difluorphenoxyderivat eine dreifach höhere Synthesehemmung für PGE_2. Mit 1 x 10^{-5} mol/l dieser Substanz wird halbmaximale Inhibition ebenso wie mit Benoxaprofen erreicht (Abbildung 14).

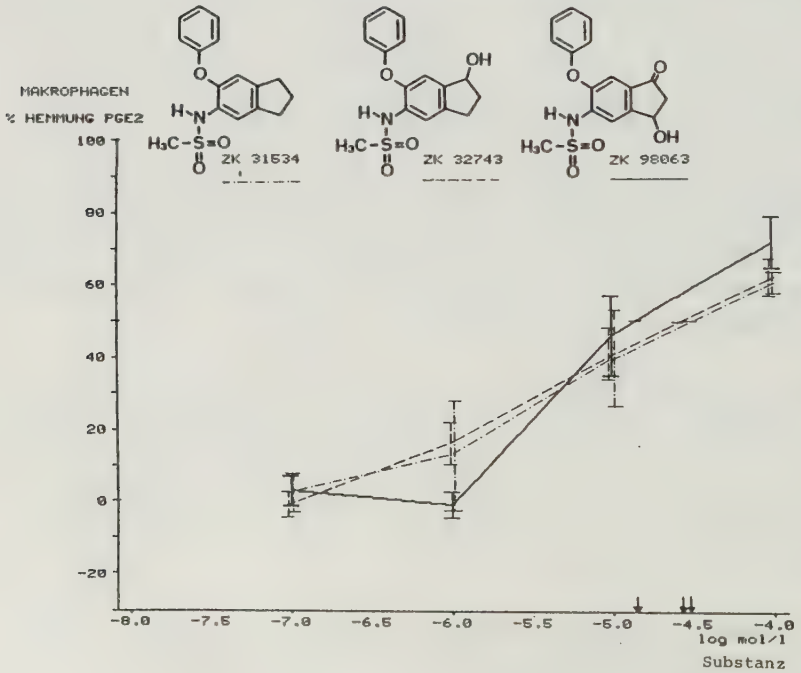
Auch bei diesem Wirkstoff war bei 10^{-4} mol/l eine erhöhte Konzentration von 5-HETE, Arachidonsäure und der Eicosanoide des Peaks IV zu beobachten (3fache, 1,5fache bzw. 14fache Menge der Zymosankontrolle), verbunden mit einer erhöhten Zellschädigungsrate, die allerdings mit ca. 30 % geringer war als bei ZK 33612 (Tabelle 27a).

In den anderen getesteten Dosisbereichen (10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} mol/l) fiel keine Abweichung von der Zymosankontrolle auf.

4.1.2.5 1-Hydroxyindane (ZK 32743, ZK 91182)

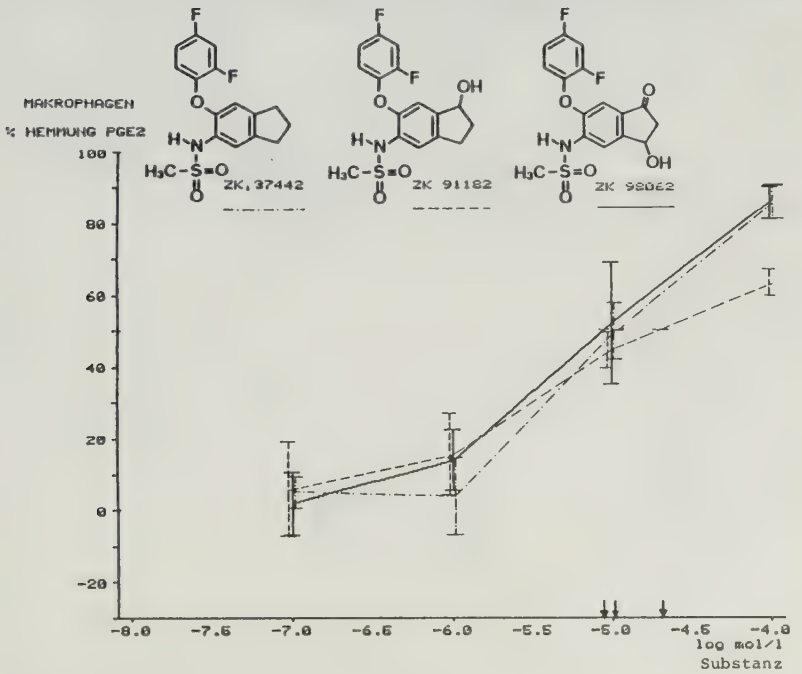
Durch Einführung einer 1-OH-Gruppe in das Indansystem verändern sich die biochemischen Eigenschaften im Vergleich zum unsubstituierten System. In der nichtfluorierten Reihe - beim Vergleich von ZK 31534 und ZK 32743 - führt Hydroxylierung des Indans nicht zu einer nennenswerten Veränderung der inhibitorischen Aktivität für die PGE_2-Synthese. Dagegen wird in der difluorsubstituierten Reihe eine Abschwächung der PGE_2-Synthesehemmung nachge-

Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 31534, ZK 32743 und ZK 98063 (▼: IC_{50}-Werte).



wiesen (IC_{50}-Vergleich: 1,0 x 10^{-5} mol/l bei ZK 37442 und 2,0 x 10^{-5} mol/l bei ZK 91182 sowie 2,5 x 10^{-5} mol/l bei ZK 32743). Da sowohl durch ZK 32743 als auch durch ZK 91182 nur wenig über 60 % Hemmung durch Substanzkonzentrationen von 10^{-4} mol/l erreicht wurde, war der Kurvenverlauf beider Dosis-Wirkungs-Beziehungen nahezu identisch (Abbildungen 15, 16).

Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 37442, ZK 91182, ZK 98062 (↓: IC_{50}-Werte).

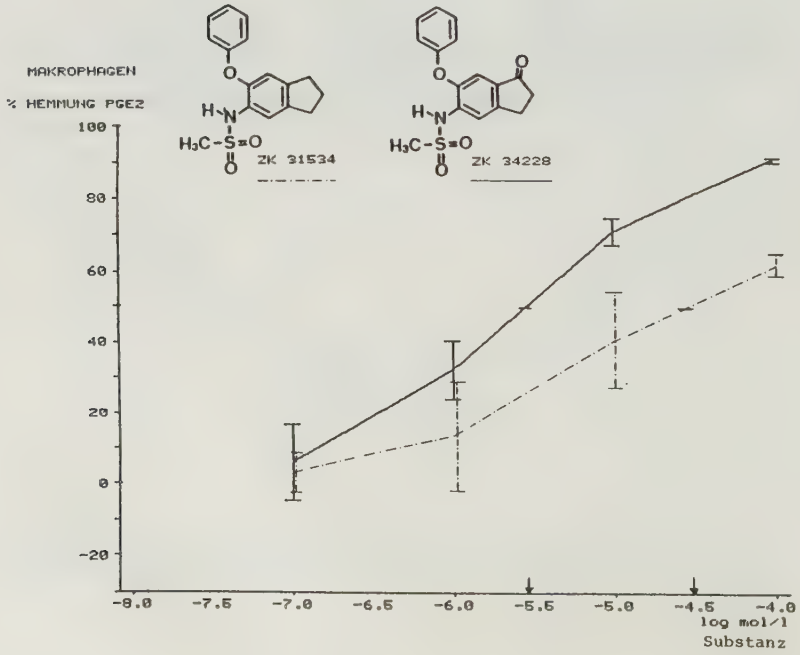


Wie bei Nimesulid konnte bei beiden Substanzen ein schwacher Effekt auf die 5-HETE-Bildung beobachtet werden (25 % Hemmung bei 10^{-4} mol/l), während die Arachidonsäurekonzentration im Dosisbereich keine Abweichungen von der Zymosankontrolle erbrachte (Tabellen 24a, 30a).

4.1.2.6 1-Oxoindane (ZK 34228, ZK 38997)

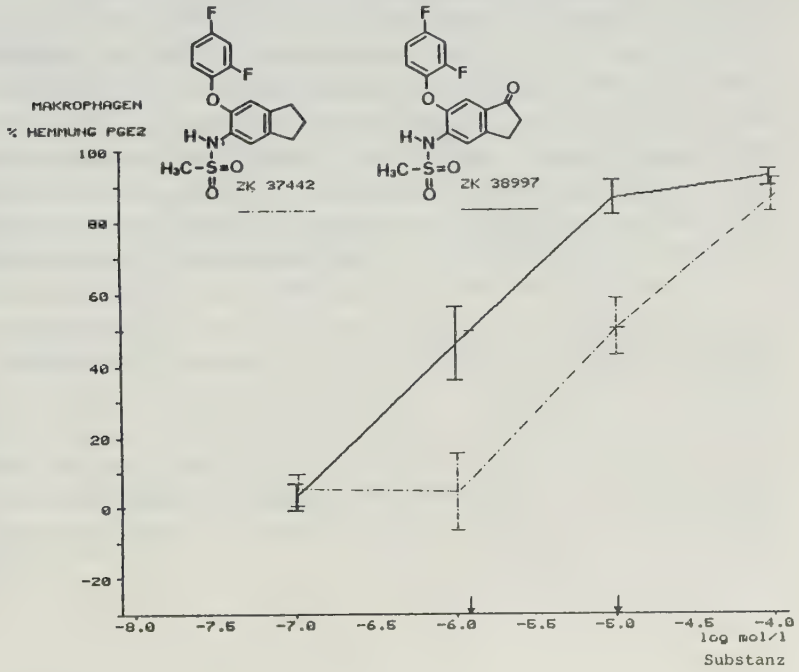
Die 1-Oxoindanderivate ZK 34228 und die analoge 2,4-Difluorphenoxyverbindung ZK 38997 zeigten beide eine ausgeprägte do-

Abbildung 17: Dosis- Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 31534 und ZK 34228 (↓: IC_{50}-Werte).



sisabhängige Hemmung der Cyclooxygenase. Die PGE_2-Synthese wurde durch diese Substanzen im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-7} mol/l dosisabhängig gehemmt. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ließ sich für die nichtfluorierte Verbindung ein IC_{50}-Wert von 2,8 x 10^{-6} mol/l berechnen. Für ZK 38997 liegt dieser Wert bei 1,3 x 10^{-6} mol/l. Daraus ergibt sich eine Wirkungssteigerung beim Vergleich dieser Substanzen mit den beiden Indanen ZK 31534 und ZK 37442 jeweils um den Faktor 10 durch die Einführung der Ketofunktion. Durch die 2,4-Difluorierung des Phenoxysubstituenten bei ZK 38997 wurde, wie schon im Falle von ZK 37442 beobachtet, auch bei den Oxoindanen eine Wirkungssteigerung gegenüber dem nichtfluorierten Derivat erreicht (Abbildungen 17, 18).

Abbildung 18: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 37442 und ZK 38997 (↓: IC_{50}-Werte).



Die sowohl bei Nimesulid als auch bei den 1-Hydroxyindanen ZK 32743 und ZK 91182 zu beobachtende schwache Hemmung der 5-Lipoxygenase war auch bei diesen beiden Verbindungen im Makrophagentest festzustellen (Tabellen 26a, 28a).

Der Gehalt an freier Arachidonsäure im Überstand der Zellen unterschied sich in keiner der getesteten Konzentrationsstufen von dem der Zymosankontrollansätze.

4.1.2.7 1-Oxo-3-hydroxyindane (ZK 98063, ZK 98062)

3-Hydroxylierung des 1-Oxoindansystems verändert die Aktivität in Bezug auf die Prostaglandinsynthesehemmung. Die durch die 1-Oxosubstitution erzielte Wirkungssteigerung in ZK 34228 und ZK 38997 wird weitgehend aufgehoben. Mit IC_{50}-Werten von $1,4 \times 10^{-5}$ mol/l für ZK 98063 sowie $8,9 \times 10^{-6}$ mol/l für das difluorierte Derivat (ZK 98062) lagen diese Hemmwerte bei nur wenig geringeren Konzentrationen als bei den unsubstituierten Indanen ZK 31534 und ZK 37442 und deutlich höher als bei den Oxoindanen ZK 34228 und ZK 38997. Beim Vergleich der beiden Substanzen untereinander erwies sich erneut die difluorierte (ZK 98062) als wirksamer (Abbildungen 15, 16).

Eine Beeinflussung der 5-HETE-Bildung konnte in dem untersuchten Dosisbereich von 10^{-4} bis 10^{-7} mol/l ebensowenig wie eine Veränderung der Arachidonsäurekonzentration nachgewiesen werden (Tabellen 34a, 33a).

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen am phenoxy-substituierten Indanstrukturtyp lassen folgende Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu (Tabelle 13):

. Einfluß der NH-Acidität

Paraständige Ketofunktionen acidifizieren das Methansulfonanilid . Während ZK 31534 mit einem pk_a-Wert von 9,4 unter biologischen Bedingungen nicht nennenswert in dissoziierter Form vorliegt, führt der acidifizierende Effekt der paraständigen Carbonylgruppe in ZK 34228 zu einer deutlichen pk_a-Wert-Erniedrigung: Mit einem pk_a-Wert von 7,0 ist ZK 34228 zwar im Vergleich zu anderen sauren NSE eine deutlich schwächere Säure, der vorliegende anionische Anteil in der amphiphilen Struktur ist jedoch im Einklang mit den Ergebnissen anderer NH-acider Wirkstoffe aus der Imidazolreihe.

Qualitativ vergleichbar sind die Substituenteneffekte in der difluorierten Reihe, so daß sich durch kombinierte Substituenteneffekte in ZK 38997 das potenteste Indanderivat ergibt. Im Vergleich zum nichtfluorierten Oxoindan kann noch eine Verdoppelung der Aktivität erzielt werden.

Ein weiterer Beweis für die Bedeutung der NH-Acidität als Wirkungsvoraussetzung ergibt sich aus dem Vergleich von Nimesulid mit ZK 34228: Durch die paraständige Nitrogruppe läßt sich beim Nimesulid eine Erhöhung der NH-Acidität erreichen; mit einem pk_a-Wert von 6,5 und einer IC_{50} für die PGE_2-Synthese von 2,8 x 10^{-6} mol/l sind sich Nimesulid und ZK 34228 in ihren physikalisch-chemischen und pharmakologischen Eigenschaften auffallend ähnlich.

Wie die Untersuchungen an Trifluormethansulfonaniliden zeigen, führt auch hier die drastische Erhöhung der Acidität zu einer Wirkungssteigerung bei der PGE_2-Synthesehemmung.

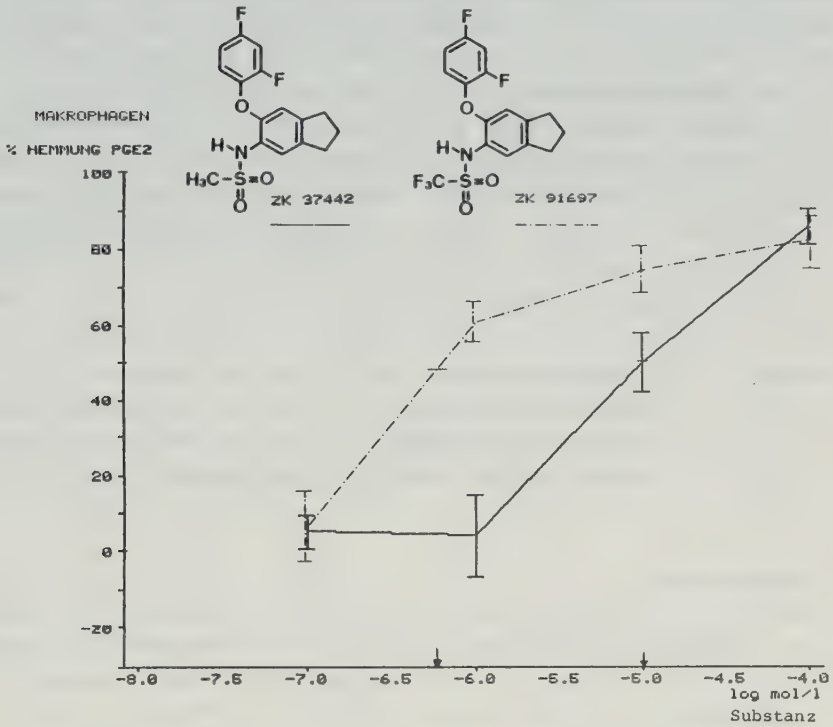
. Einfluß der Fluorsubstitution am Diphenylethersystem

Aus einem Vergleich der monofluorierten und difluorierten Indanderivate mit dem unsubstituierten Strukturtyp geht hervor, daß - wie auch von anderen nichtsteroidalen Wirkstoffen bekannt - durch die orthoständige Fluorsubstitution eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung erzielt werden kann, während die Einführung eines Parafluorsubstituenten keinen nennenswerten Einfluß auf die PGE_2-Synthesehemmung hat. Orthofluorsubstitution fixiert demnach die nicht koplanare Anordnung des Diphenylethersytems, so daß in diesem Falle die für eine hydrophobe Wechselwirkung zur Verfügung stehende Teilstruktur in einer definierten verdrehten Anordnung zum Indangerüst vorliegt.

4.1.2.8 Trifluormethanderivate (ZK 91288, ZK 91697)

An zwei Beispielen sollte untersucht werden, welchen Einfluß der Austausch einer Methylgruppe gegen eine Trifluormethylgruppe auf die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten durch Makrophagen hat. Der Vergleich der Trifluormethanverbindungen ZK 91288 mit Nimesulid sowie von ZK 91697 mit ZK 37442 zeigte eine erhebliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität für die PGE_2-Synthese. So erwies sich ZK 91288 als die nach Indometacin wirksamste aller getesteten Substanzen mit einem IC_{50}-Wert von 1×10^{-7} mol/l (Abbildung 19).

Abbildung 19: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der PGE_2-Bildung durch Makrophagen unter dem Einfluß von ZK 37442 und ZK 91697 (↓: IC_{50}-Werte).



Die Erhöhung der NH-Acidität durch die CF_3-Gruppe bewirkte eine deutliche Erhöhung der Hemmwirkung sowohl im Falle von ZK 91288 als auch bei ZK 91697, verglichen mit den Methanderivaten Nimesulid bzw. ZK 37442.

Die bei Nimesulid zu beobachtende schwache Hemmung der 5-HETE-Bildung konnte im Falle von ZK 91288 nicht beobachtet werden; es war im Gegenteil eine schwache Steigerung bei 10^{-4} mol/l (41 %) festzustellen, die nur bei dieser Substanzdosis auftrat (Tabelle 31a).

Die bei ZK 91697 nachweisbare erhöhte Freisetzung von 5-HETE, Arachidonsäure und der Metaboliten des Peaks IV (etwa 2fache, 4fache bzw. 5fache Menge) im Überstand der stimulierten Makrophagenkulturen könnte auch in diesem Falle (wie bei ZK 33612 und ZK 37442) mit einer cytotoxischen Wirkung dieser Verbindung in Zusammenhang stehen. Bei der Untersuchung des Trypanblauausschlusses erwiesen sich 33 % der Zellen als geschädigt. Bei 10^{-5} (Viabilität > 90 %) und 10^{-6} mol/l war eine schwache Hemmung der 5-HETE-Synthese nachzuweisen (25 %) (Tabelle 32a).

4.2 Granulocytenmodell

4.2.1 "Standardsubstanzen": Einfluß auf die Bildung von Lipoxygenaseprodukten

4.2.1.1 Hemmstoffe des Enzyms Cyclooxygenase

Indometacin

Die Auswertung der Versuche mit Indometacin ergab keine Hinweise auf einen hemmenden oder stimulierenden Effekt auf die Lipoxygenase. Im Dosisbereich von 10^{-4} - 10^{-7} mol/l zeigte sich weder qualitativ noch quantitativ eine Veränderung der Reaktionsprodukte im Vergleich zur Kontrollreaktion, und auch die Konzentration an freier Arachidonsäure blieb konstant (Tabelle 16b).
Diese Befunde unterscheiden sich teilweise von den Ergebnissen anderer Autoren, die mit Granulocyten verschiedener Spezies zu uneinheitlichen Ergebnissen gelangen (siehe Tabelle 14). Mit Kaninchengranulocyten arbeiteten die Arbeitsgruppen um WALKER (1980) (Stimulation mit Ionophor A 23187) und RANDALL (1980) (unstimulierte Zellen), und beide wiesen eine schwache (ca. 20 %)

Steigerung der 5-HETE- und LTB_4-Bildung nach. Während dieser stimulierende Effekt des Indometacins von WALKER et al. auch bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/l beobachtet wurde, konnten RANDALL et al. eine deutliche Hemmung der 5-HETE-Produktion bei dieser Substanzkonzentration messen.

MYERS und SIEGEL (1983) zeigten an einem PMN-Modell (Ratte, Stimulation mit A 23187 und BRIJ 56), daß in einem Konzentrationsbereich, in dem Cyclooxygenasehemmung auftritt, eine schwache Stimulation der 5-HETE- und LTB_4-Bildung erfolgt, während AHNFELT-RØNNE und ARRIGONI-MARTELLI (1982) im gleichen System (A 23187-stimuliert) starke Inhibition der 5-Lipoxygenase bei 10^{-4} mol/l Indometacin nachgewiesen haben. Wie bei den vorliegenden Daten konnten auch SIEGEL et al. (1981) bei A 23187-stimulierten Rattengranulocyten weder einen stimulierenden noch einen hemmenden Einfluß von Indometacin auf die 5-Lipoxygenase feststellen. FRUCHTMANN et al. (1984) konnten ebenfalls keinen Indometacineffekt im PMN-Modell an der Ratte nachweisen.

Die uneinheitlichen Resultate mit Granulocyten derselben Spezies verdeutlichen die begrenzte Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Autoren auch bei nur wenig voneinander abweichender Versuchsmethodik.

Pirazolac

Ähnlich indifferent wie Indometacin verhielt sich auch Pirazolac bei dieser Versuchsanordnung. Die Resultate der Versuche zeigten, daß dieser Wirkstoff nicht die 5-Lipoxygenaseaktivität von humanen Granulocyten beeinflußt. Ebenso wie bei Indometacin war weder die Bildung eines der beiden über diesen enzymatischen Weg gebildeten Metaboliten gehemmt, noch die Konzentra-

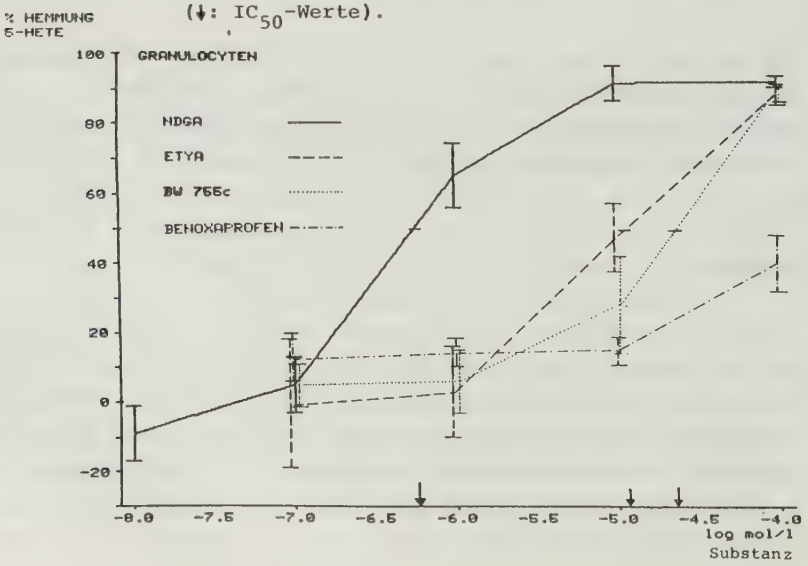
tion von freier Arachidonsäure im Vergleich zur Kontrollreaktion verändert. Daher kann man davon ausgehen, daß die nachgewiesene antiinflammatorische Wirksamkeit dieser Substanz (BIERE et al., 1982) gut mit ihrer Cyclooxygenasehemmung korreliert (Tabelle 17b).

4.2.1.2 Hemmstoffe des Enzyms Lipoxygenase

NDGA

Als der potenteste der Lipoxygenasehemmstoffe erwies sich in diesen Untersuchungen NDGA (Nordihydroquajaretsäure). Eine dosisabhängige Hemmung konnte im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-7} mol/l nachgewiesen werden. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ließ sich ein IC_{50}-Wert von 5×10^{-7} mol/l bestimmen (Abbildung 20).

Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der 5-HETE-Bildung durch Granulocyten unter dem Einfluß von NDGA, ETYA, BW 755C und Benoxaprofen (↓: IC_{50}-Werte).



Dieser Wert ist gut vergleichbar mit den nach Abschluß der experimentellen Arbeiten publizierten Werten von FRUCHTMANN et al. (1984). Die Ergebnisse weisen keine Präferenz des Wirkstoffes für die Hemmung eines der beiden Metaboliten 5-HETE und LTB_4 auf, so daß davon ausgegangen werden kann, daß durch NDGA die Bildung von 5-HPETE, ihrer gemeinsamen Vorstufe, gehemmt wird (Tabelle 21b).

Der Vergleich dieser Resultate mit denen anderer Autoren (siehe Tabelle 14) zeigte zwar qualitativ gleiche Effekte bei deren Untersuchungen (NDGA jeweils der potenteste Inhibitor der 5-Lipoxygenase; gleiche Hemmwirkung auf die Bildung von 5-HETE und LTB_4). Jedoch werden von verschiedenen Autoren unterschiedliche IC_{50}-Werte angegeben: bei AHNFELT-RØNNE und ARRIGONI-MARTELLI (1982) 4fache Werte, bei HARVEY und OSBORNE (1983) 8fache Werte.

BW 755C, ETYA, Benoxaprofen

Die von verschiedenen Autoren für diese Substanzen beschriebene Lipoxygenasehemmung konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden. Das Strukturanaloge der Arachidonsäure, ETYA, war mit einem IC_{50}-Wert von 1×10^{-5} mol/l für die Lipoxygenasehemmung im gleichen Konzentrationsbereich wirksam wie BW 755C (IC_{50}: 2×10^{-5} mol/l). Beide Substanzen zeigten eine dosisabhängige Inhibition der 5-HETE- und LTB_4-Bildung im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-6} mol/l (Abbildung 20, Tabellen 19b, 20b).
Benoxaprofen führte nur in der höchsten getesteten Substanzkonzentration (10^{-4} mol/l) zu einer annähernd halbmaximalen Hemmung der 5-HETE- und LTB_4-Bildung (Abbildung 20, Tabelle 18b).

Bei allen drei Substanzen konnte ähnlich wie bei NDGA beobachtet werden, daß sowohl 5-HETE-als auch LTB_4-Produktion in identischer Weise beeinflußt wurden. Daher kann man auch bei diesen Substanzen davon ausgehen, daß die Bildung der gemeinsamen Vorstufe 5-HPETE beeinflußt wird.

Der Vergleich der erhaltenen Werte mit den in Tabelle 14 aufgeführten Ergebnissen zeigt, daß die meisten Autoren für die halbmaximale Hemmung höhere Konzentrationen an BW 755C, ETYA und NDGA benötigen, als bei den hier durchgeführten Versuchen erforderlich war.

Die umgekehrte Beobachtung wurde bei Benoxaprofen gemacht: Während sich bei diesen Versuchen wegen mangelnden Hemmpotentials im untersuchten Dosisbereich (10^{-4} - 10^{-7} mol/l) kein IC_{50}-Wert ermitteln ließ, lag bei den anderen Untersuchern dieser Wert bei schwächeren Konzentrationen als 10^{-4} mol/l bzw. in einem Fall darüber (MYERS und SIEGEL, 1983). Gemeinsam weisen diese Zahlen Benoxaprofen einen Platz unter den schwach wirksamen Lipoxygenasehemmstoffen zu, wodurch sie sich im Gegensatz zur Interpretation von MEAKOCK und KITCHEN (1979) befinden. Diese Autoren postulierten, daß Benoxaprofen zu einer Leukocytenmigrationshemmung führt, ohne daß eine Interaktion mit chemotaktischen Faktoren (Leukotrienen) erfolgt.

4.2.1.3 Radikalfänger

MK 447

Auch in diesem Modell mit intakten Zellen war kein eindeutiger Effekt dieser in Samenmikrosomenpräparationen als Sauerstoffradikalfänger wirksamen Substanz nachzuweisen. Bis auf einen schwachen stimulierenden Effekt (+ 23 %) auf die 5-HETE-Bildung bei einer Substanzmenge von 10^{-4} mol/l konnte keine Veränderung gegenüber der Kontrollreaktion festgestellt werden (Tabelle 22b).
Untersuchungen von KUEHL et al. (1980) an phagocytierenden Granulocyten legen die Vermutung nahe, daß es sich bei dem von diesen Zellen produzierten potenten oxidierenden Agens ebenfalls um ein Hydroxylradikal handelt, wie es vermutlich auch bei der Prostaglandinperoxidasereaktion gebildet wird. Daher müßte die bei der Lipoxygenasereaktion entstehende reaktive Sauerstoffspezies ebenso empfindlich gegenüber Radikalfängern reagieren wie diejenige aus der Prostaglandinendoperoxidasereaktion. Unter dem Einfluß von Radikalfängern würde so eine gewebsschädigende Wirkung verhindert. Dieser Effekt der Radikalfänger wird offenbar besonders deutlich an Gewebe- und Zellhomogenaten, während er sich bei intakten Zellen nicht durch eine vermehrte Bildung von Prostaglandin bzw. Lipoxygenaseprodukten nachweisen läßt.

Tabelle 14: Zusammenstellung von IC_{50}-Angaben verschiedener Autoren für die 5-Lipoxygenasehemmung durch Indometacin, NDGA, BW 755C, Benoxaprofen und ETYA.

Autor	Herkunft der Granulocyten	Stimulus	Analytik	IC_{50}-Werte für 5-Lipoxygenasehemmung [mol/l]				
				Indom.	NDGA	BW 755C	Benox.	ETYA
WALKER, DAWSON, 1979	Kaninchen Peritoneum	A 23187	Radio-TLC/ Scint.-Messung	Stim.			6×10^{-5}	
WALKER et al., 1980	Kaninchen Peritoneum	A 23187	Radio-TLC/ Scint.-Messung	Stim.	3×10^{-6}	1×10^{-4}	nicht erreicht	
RANDALL et al., 1980	Kaninchen Peritoneum	ohne Stimulus	Radio-TLC/ Scint.-Messung	Stim., 10^{-4} Inhibitor (40 %)		3×10^{-5}		
SIEGEL et al., 1981	Ratte Peritoneum	A 23187	Radio-TLC/ Scint.-Messung	weder Stim. noch Inhibit.		6×10^{-5}		2×10^{-5}
AHNFELT-R., ARRIGONI-M., 1982	Ratte Peritoneum	A 23187	Radio-TLC/ Scint.-Messung	1×10^{-4}	2×10^{-6}	3×10^{-5}	9×10^{-5}	
MARDIN, BUSSE, 1983	Mensch periph. Blut	A 23187	RP-HPLC		3×10^{-6}			
MYERS, SIEGEL, 1983	Ratte Pleuralhöhle	A 23187 + BRIJ56	Radio-TLC/ Scint.-Messung	Stim.		3×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-4}$	
HARVEY, OSBORNE, 1983	Meerschw. Peritoneum	A 23187	Radio-TLC/ Scanner	Stim.	4×10^{-6}	2×10^{-5}	6×10^{-5}	
FRUCHTMANN et al., 1984	Ratte Peritoneum	A 23187	RP-HPLC	weder Stim. noch Inhib.	7×10^{-7}	$2,4 \times 10^{-5}$		
Eigene Untersuchungen	Mensch periph. Blut	A 23187	Radio-TLC/ Scanner	weder Stim. noch Inhib.	5×10^{-7}	2×10^{-5}	bei 1×10^{-4} 40 % Inhib.	1×10^{-5}

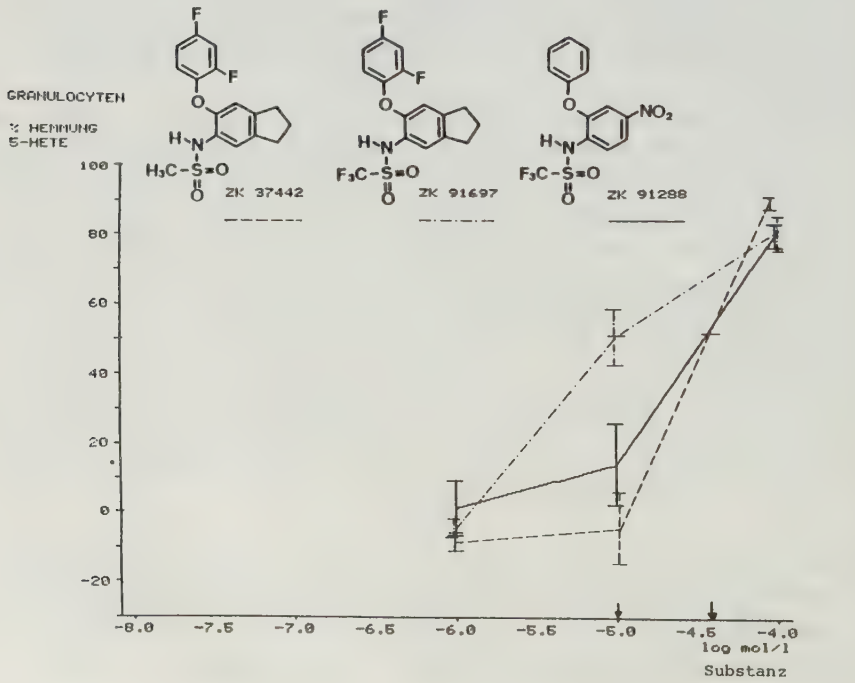
4.2.2 Methansulfonanilide

Bei den zwölf im Granulocytenmodell untersuchten Methansulfonaniliden ergab sich - mit Ausnahme von drei Substanzen - kein Hinweis auf eine Beeinflussung der 5-Lipoxygenase. Bei allen drei verwendeten Substanzkonzentrationen (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} mol/l) zeigte sich weder qualitativ noch quantitativ ein abweichendes Bild im Vergleich zur Kontrollreaktion. Lediglich die trifluormethylsubstituierte Variation des Nimesulid (ZK 91288), das trifluormethylsubstituierte ZK 91697 sowie das strukturanaloge Methansulfonanilid ZK 37442 zeigten bei der höchsten untersuchten Dosis (10^{-4} mol/l) starke Hemmwirkungen sowohl auf die Bildung von 5-HETE als auch auf die von LTB_4. Im Falle des ZK 91697 ergaben sogar noch 10^{-5} mol/l etwa 50%ige Inhibition, während die beiden anderen Substanzen bei dieser Konzentration keine Wirkungen mehr zeigten (Abbildung 21, Tabellen 27b, 31b, 32b).
Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise toxische Einflüsse der Substanzen auf die Zellen bei 10^{-4} mol/l als Ursache für die starke Produktionshemmung verantwortlich gemacht werden können, wurde die Viabilität der Zellen nach 10 Minuten Inkubation durch die Farbstoffausschlußmethode untersucht. Ebenso wie bei den anderen Methansulfonaniliden und Substanzen ergab sich auch bei diesen drei Wirkstoffen mit einer Viabilitätsrate von > 90 % kein Hinweis auf eine Zellschädigung. Allerdings zeigten bei den Untersuchungen mit Makrophagen die Substanzen ZK 91697 und ZK 37442 bei der 4-stündigen Inkubationsphase toxische Einflüsse auf die Zellen, so daß diese auch bei den Granulocyten nicht absolut auszuschließen sind.

Ein bemerkenswertes Ergebnis ist die bei ZK 37442 beobachtete starke Stimulierung (+ 400 %) der Produktion von Metabolit IV, vermutlich 15-HETE, die sich in wesentlich geringerem Maße (+ 30 %) auch bei ZK 91697 und ZK 91288 zeigte. 15-HETE hat

sich als selektiver Hemmstoff des 5- und 12-Lipoxygenaseweges erwiesen (VANDERHOEK et al., 1980 a, b). Deshalb könnte die Stimulierung der Bildung dieses endogenen Lipoxygenasehemmstoffes durch ZK 37442, ZK 91697 und ZK 91288 eine mögliche Erklärung für die gleichzeitig beobachtete 5-Lipoxygenasehemmung sein. Ein ähnliches Ergebnis erzielten MARDIN und BUSSE (1983) mit Nafazatrom und NDGA. Mit letzterem Wirkstoff ließ sich diese Beobachtung hier nicht machen.

Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der 5-HETE-Bildung durch Granulocyten unter dem Einfluß von ZK 37442, ZK 91697 und ZK 91288 (↓: IC_{50}-Werte).



4.3 Vergleich des Cyclooxygenasehemmpotentials in vitro mit der antiinflammatorischen Wirksamkeit in vivo

Während beim Vergleich der inhibitorischen Aktivität im in-vitro-System eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen erhalten werden, ist bei einer Bewertung der Ergebnisse präklinischer Wirksamkeitsnachweise auch das pharmakokinetische Verhalten der Wirkstoffe in Betracht zu ziehen.

Die aus den Makrophagentests für die verschiedenen Methansulfonanilide hervorgehenden Aktivitätsparameter zeigen Übereinstimmung mit den Daten orientierender präklinischer Untersuchungen, die zur antiinflammatorischen Wirksamkeit in vivo für einige Substanzen bereits publiziert wurden (SCHRÖDER, 1982; RUFER, 1982 b) (Tabelle 15).

Auffallend ist, daß sowohl im Adjuvans-Arthritis-Test als auch im Makrophagenmodell jeweils die 2,4-difluorierten Verbindungen (ZK 37442, ZK 38997) stärker wirksam waren als die nichtfluorierten Substanzen (ZK 31534, ZK 34228). Auch an der Ratte führt Difluorsubstitution zu einer Verstärkung des Effektes um den Faktor 5-10.

Bei der Beantwortung der Frage, welchen Einfluß die Einführung eines Fluoratoms in die 4-Stellung des Phenoxysubstituenten auf die Wirksamkeit des Moleküls hat, zeigte sich sowohl in den in-vivo-Modellen (Adjuvans-Arthritis- und Carrageenin-Ödem-Test) an der Ratte als auch bei der PGE_2-Synthesehemmung bei Makrophagen kein Unterschied.

Die deutlichsten Unterschiede in Hinblick auf die Cyclooxygenasehemmwirkung in vitro wurden zwischen den Indanderivaten (ZK 31534 und ZK 37442) und den entsprechenden Oxoindanen (ZK 34228 und ZK 38997) festgestellt (Oxoindane etwa 10fach stärker wirksam). In vivo wurde dieser Unterschied nicht beobachtet: Sowohl im Adjuvans-Arthritis-Test als auch im Carrageenin-Ödem-

Test waren die Indane etwa ebenso wirksam wie die Oxoindane. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in dem Prodrug-Charakter der Indane (BÖTTCHER, 1981). Diese sind nach oraler Gabe z.B. bei der Ratte nicht im Blut nachzuweisen. Vielmehr konnten die am Indanring oxidierten Methansulfonanilide, darunter als Hauptmetaboliten die 1-Oxoindane ZK 34288 und ZK 38997, aus dem Blut isoliert werden. Die Oxoindane mit dem bei den untersuchten Methansulfonaniliden stärksten Hemmpotential stellen also vermutlich das antiinflammatorisch wirksame Prinzip der Indane in den in-vivo-Versuchen an der Ratte dar. Das würde die gleiche Wirkungsstärke der Indane und der Oxoindane in vivo bei unterschiedlicher inhibitorischer Aktivität in vitro erklären.

Die qualitativ gute Korrelation der Ergebnisse aus dem Makrophagenmodell und den in-vivo-Untersuchungen läßt wie bei den herkömmlichen NSE auch bei den Methansulfonaniliden einen engen Zusammenhang zwischen der Prostaglandinsynthesehemmung und der antiinflammatorischen Potenz dieser Substanzen erkennen. Für verschiedene andere NSE (z.B. Indometacin, Phenylbutazon, Diclofenac, Ketoprofen) verdeutlichen u.a. BRUNE et al. in einer Publikation von 1979 diesen Zusammenhang. Beim Vergleich der IC_{50}-Werte für die Hemmung der PGE_2-Bildung bei Makrophagen mit den ED_{50}-Werten der antiinflammatorischen Wirksamkeit in vivo (Carrageenin-Ödem-Test) zeigte sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung der in-vitro- und in-vivo-Aktivität. Lediglich das Prodrug Sulindac ergab nicht diese Korrelation, dagegen zeigte sich Übereinstimmung beim Einsatz des pharmakologisch wirksamen Metaboliten Sulindacsulfid.

Welcher Mechanismus der Tatsache zu Grunde liegt, daß die Methansulfonanilide trotz ihres Cyclooxygenasehemmpotentials sowohl in akuten als auch in chronischen Ulcusmodellen besser verträglich sind als andere NSE (z.B. Indometacin, Piroxicam), bedarf einer weiteren Klärung.

Tabelle 15: Daten zur in-vivo-Wirksamkeit einiger Methansulfonanilide im Carrageenin-Ödem- und Adjuvans-Arthritis-Test (Ratte) (aus SCHRÖDER, 1982; RUFER, 1982 b)

	Carr.-Ödem-Test % Hemmung bei		Adjuv.-Arthritis-Test Wirkstärke (*)
	15 mg/kg	75 mg/kg	
ZK 31534	33	46	+++
ZK 32743	39	47	++
ZK 33612	22	43	+++
ZK 34228	43	69	(+)+++
ZK 37442	52	46	+++++
ZK 38997	57	54	+++++
Indometacin			++++
Piroxicam			+++++

(*) ED (mg/kg)
40 % Hemmung

0,3 - 1	+++++
1 - 3	++++
3 - 10	+++
10 - 30	++
30 - 50	+
50	-

INDOMETACIN / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	106	96					14	18				
1E-5 M	110	91	76	91	92	88	16	24	30	23	25	24
1E-6 M	91	85	79	87	100	77	36	26	40	23	27	44
1E-7 M	98	105	90	82	95	83	45	47	50	42	36	48
1E-8 M	96	101	95	113	106	86	102	99	92	89	88	81

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	101	6,6	-1	2	16	3,2	84	2
1E-5 M	91	11,1	9	6	23	4,5	77	6
1E-6 M	86	8,4	14	6	33	8,6	67	6
1E-7 M	92	8,9	8	6	45	5,1	55	6
1E-8 M	99	9,5	1	6	92	7,9	8	6

INDOMETACIN / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	13	7					95	99				
1E-5 M	13	7	11	7	7	12	96	75	82	73	72	88
1E-6 M	11	10	10	10	9	13	77	80	75	76	70	81
1E-7 M	19	30	21	30	22	19	76	85	79	80	71	80
1E-8 M	71	78	76	79	82	73	91	105	92	111	105	94

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	10	4,0	90	2	97	3,0	3	2
1E-5 M	9	2,9	91	6	81	9,8	19	6
1E-6 M	10	1,4	90	6	77	3,9	23	6
1E-7 M	23	5,3	77	6	79	4,5	21	6
1E-8 M	77	4,1	23	6	100	8,4	0	6

INDOMETACIN / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	89	96					116	99				
1E-5 M	83	95	92	76	93	78	117	100	105	95	98	102
1E-6 M	85	95	83	92	84	84	118	91	98	86	94	108
1E-7 M	67	75	79	91	80	85	107	93	95	95	97	98
1E-8 M	78	109	81	102	86	77	116	87	95	90	101	106

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	92	4,4	8	2	108	11,6	-8	2
1E-5 M	86	8,1	14	6	103	7,7	-3	6
1E-6 M	87	5,2	13	6	99	11,7	1	6
1E-7 M	80	8,1	20	6	98	5,0	2	6
1E-8 M	89	13,7	11	6	99	10,8	1	6

INDOMETACIN / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	96	82	94	106	114	116	102	100	88	117	106	126
1E-5 M	108	90	91	95	119	111	102	96	78	108	119	119
1E-6 M	108	91	100				107	90	101			
1E-7 M	86	119					92	102				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	101	13,2	-1	6	106	13,2	-6	6
1E-5 M	103	12,0	-3	6	104	15,6	-4	6
1E-6 M	100	8,4	0	3	99	8,3	1	3
1E-7 M	103	23,3	-3	2	97	6,6	3	2

INDOMETACIN / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	108	107	108	124	101	104	127	110	132	137	105	115
1E-5 M	102	92	82	106	115	114	94	90	105	117	96	102
1E-6 M	110	100	91				107	107	89			
1E-7 M	91	91					97	99				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	109	8,1	-9	6	121	12,8	-21	6
1E-5 M	102	12,8	-2	6	101	9,6	-1	6
1E-6 M	100	9,6	0	3	101	10,3	-1	3
1E-7 M	91	0,1	9	2	98	1,3	2	2

INDOMETACIN / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	111	102	107	111	107	107
1E-5 M	97	102	102	120	82	117
1E-6 M	117	105	93			
1E-7 M	95	104				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	108	3,5	-8	6
1E-5 M	103	14,0	-3	6
1E-6 M	105	11,6	-5	3
1E-7 M	99	6,5	1	2

Tabelle 16a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch Indometacin.

PIRAZOLAC / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	77	77	69	71	69	69	21	34	26	47	26	35
1E-5 M	82	95	89	79	88	76	33	52	49	57	49	46
1E-6 M	95	88	107	86	99	87	75	71	106	99	108	81
1E-7 M	95	105	99	91	99	82	117	100	110	115	101	96
1E-8 M	98	97					107	95				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	72	4,0	28	6	32	9,3	68	6
1E-5 M	85	7,1	15	6	48	8,1	52	6
1E-6 M	94	8,4	6	6	90	16,4	10	6
1E-7 M	95	8,0	5	6	106	8,5	-6	6
1E-8 M	97	0,5	3	2	101	8,6	-1	2

PIRAZOLAC / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	5	9	8	14	8	15	98	97	105	86	94	78
1E-5 M	14	22	37	25	37	27	77	91	88	100	93	95
1E-6 M	63	56	95	71	97	76	113	78	106	110	107	94
1E-7 M	118	94	117	111	117	119	132	97	93	106	94	101
1E-8 M	103	97					103	101				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	10	3,6	90	6	93	9,6	7	6
1E-5 M	27	8,6	73	6	91	7,7	9	6
1E-6 M	76	16,7	24	6	101	13,1	-1	6
1E-7 M	113	9,5	-13	6	104	14,6	-4	6
1E-8 M	100	3,9	0	2	102	1,3	-2	2

PIRAZOLAC / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	87	105	105	104	95	94	105	107	84	104	87	100
1E-5 M	92	102	109	98	86	82	93	103	99	113	104	116
1E-6 M	87	106	100	103	107	98	96	92	102	125	102	107
1E-7 M	123	117	91	108	95	104	112	111	99	113	88	115
1E-8 M	105	101					112	91				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	98	7,3	2	6	98	9,9	2	6
1E-5 M	95	10,0	5	6	105	8,4	-5	6
1E-6 M	100	7,1	0	6	104	11,6	-4	6
1E-7 M	107	12,4	-7	6	106	10,7	-6	6
1E-8 M	103	3,2	-3	2	102	15,3	-2	2

PIRAZOLAC / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	74	81	67	68	69	61	100	119	104	113	104	97
1E-5 M	88	75	108	91	101	78	87	93	107	99	108	98
1E-6 M	108	82	85	99	99	112	99	92	92	106	96	103
1E-7 M	110	96	101		100		104	98	95		96	

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	70	6,9	30	6	106	8,2	-6	6
1E-5 M	90	12,7	10	6	99	8,0	1	6
1E-6 M	98	12,0	2	6	98	5,7	2	6
1E-7 M	102	5,8	-2	4	98	4,0	2	4

PIRAZOLAC / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	96	111	118	105	117	94	115	108	98	113	129	110
1E-5 M	96	105	109	99	110	99	78	106	107	108	114	97
1E-6 M	116	105	97	105	96	104	98	116	88	108	100	98
1E-7 M	84	112	98		99		98	111	93		105	

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	107	9,9	-7	6	112	10,1	-12	6
1E-5 M	103	6,1	-3	6	101	12,6	-1	6
1E-6 M	104	7,1	-4	6	101	9,9	-1	6
1E-7 M	98	11,5	2	4	102	8,2	-2	4

PIRAZOLAC / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	98	83	113	96	108	93
1E-5 M	90	84	90	103	90	104
1E-6 M	97	102	97	106	102	99
1E-7 M	104	86	94		92	

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	99	10,6	1	6
1E-5 M	93	7,9	7	6
1E-6 M	100	3,3	0	6
1E-7 M	94	7,6	6	4

Tabelle 17a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch Pirazolac.

BENOXAPROFEN / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	70	71	63	59	66	60	23	36	29	27	28	34
1E-5 M	85	88	77	87	78	89	42	56	60	68	47	59
1E-6 M	80	96	83	100	84	96	93	79	69	82	76	99
1E-7 M	100	102	73	112	81	116	104	81	93	92	88	106
1E-8 M	104		90	108			103		101	93		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	65	5,0	35	6	29	4,8	71	6
1E-5 M	84	4,9	16	6	55	9,3	45	6
1E-6 M	90	8,3	10	6	83	11,3	17	6
1E-7 M	98	16,9	2	6	94	9,7	6	6
1E-8 M	101	9,4	-1	3	99	5,2	1	3

BENOXAPROFEN / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	14	11	13	13	12	14	62	80	72	66	65	85
1E-5 M	38	33	53	63	50	68	76	99	112	101	90	119
1E-6 M	91	87	75	93	74	93	103	111	110	105	91	127
1E-7 M	102	87	94	111	82	104	113	124	121	120	125	142
1E-8 M	102		108	99			103		107	95		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	13	1,2	87	6	72	9,0	28	6
1E-5 M	51	13,4	49	6	99	15,3	1	6
1E-6 M	86	8,6	14	6	108	11,9	-8	6
1E-7 M	97	11,1	3	6	124	9,9	-24	6
1E-8 M	103	4,3	-3	3	101	6,1	-1	3

BENOXAPROFEN / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	131	149	140	133	125	130	121	126	124	114	113	107
1E-5 M	106	94	121	96	103	110	100	107	123	120	118	108
1E-6 M	99	88	92	114	80	104	108	101	88	118	102	105
1E-7 M	101	104	94	114	80	107	101	89	87	110	102	108
1E-8 M	96		111	89			98		89	111		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	135	8,7	-35	6	117	7,5	-17	6
1E-5 M	105	10,0	-5	6	113	9,0	-13	6
1E-6 M	96	12,0	4	6	104	9,7	-4	6
1E-7 M	100	11,8	0	6	100	9,6	0	6
1E-8 M	99	11,5	1	3	99	11,2	1	3

BENOXAPROFEN / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	84	78	95	79	79	88	48	58	51	51	66	65
1E-5 M	91	95	103	87	95	95	89	89	96	85	90	90
1E-6 M	105	103	99	101	91	78	93	90	99	89	88	87
1E-7 M			99	90					88	81		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	84	6,5	16	6	57	7,6	43	6
1E-5 M	95	5,4	5	6	90	3,4	10	6
1E-6 M	96	10,1	4	6	91	4,3	9	6
1E-7 M	94	6,3	6	2	85	5,5	15	2

BENOXAPROFEN / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	54	55	55	59	63	77	108	96	128	140	130	118
1E-5 M	85	84	93	82	88	86	107	96	111	94	97	87
1E-6 M	87	86	85	79	92	88	98	104	103	99	98	81
1E-7 M			93	82					110	87	0	0

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	61	8,6	39	6	120	16,3	-20	6
1E-5 M	86	3,9	14	6	99	8,7	1	6
1E-6 M	86	4,3	14	6	97	8,4	3	6
1E-7 M	87	7,8	13	2	49	57,6	51	4

BENOXAPROFEN / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	168	157	143	174	182	176
1E-5 M	109	100	105	78	110	104
1E-6 M	95	108	99	86	95	89
1E-7 M			111	87		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	167	14,5	-67	6
1E-5 M	101	11,8	-1	6
1E-6 M	95	7,8	5	6
1E-7 M	99	16,6	1	2

Tabelle 18a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch Benoxaprofen.

ETYA / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	56	70	56	72	80	58	14	32	30	26	28	17
1E-5 M	69	96	73	99	90	70	42	33	34	37	35	45
1E-6 M	86	88	85	97	101	86	83	83	77	75	83	73
1E-7 M	115	125	101	127	106	109	103	104	113	117	106	97
1E-8 M	104	101	97				104	98	116			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	66	9,9	34	6	25	7,4	75	6
1E-5 M	83	13,7	17	6	38	4,7	62	6
1E-6 M	91	6,8	9	6	79	4,5	21	6
1E-7 M	114	10,6	-14	6	107	7,1	-7	6
1E-8 M	100	3,4	0	3	106	9,1	-6	3

ETYA / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	36	28	25	21	34	26	7	9	6	7	9	7
1E-5 M	47	46	56	42	60	47	36	57	47	54	42	52
1E-6 M	81	108	69	87	99	77	85	93	67	78	93	66
1E-7 M	85	113					87	102				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	28	5,6	72	6	8	1,4	92	6
1E-5 M	50	6,8	50	6	48	8,0	52	6
1E-6 M	87	14,6	13	6	80	12,0	20	6
1E-7 M	99	19,8	1	2	94	10,6	6	2

ETYA / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	19	11	12	12	10	19	52	45	50	48	51	49
1E-5 M	23	22	22	21	24	24	55	37	58	37	53	57
1E-6 M	93	73	102	86	91	83	61	75	81	78	73	69
1E-7 M	115	124	130	120	114	124	102	105	94	103	94	82
1E-8 M	101	124	97				102	97	102			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	14	4,2	86	6	49	2,4	51	6
1E-5 M	22	1,3	78	6	50	9,8	50	6
1E-6 M	88	9,6	12	6	73	7,1	27	6
1E-7 M	121	6,2	-21	6	97	8,5	3	6
1E-8 M	107	14,2	-7	3	100	3,1	0	3

ETYA / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	18	11	8	10	14	10	32	39	32	34	42	30
1E-5 M	61	41	64	50	61	40	102	89	85	77	80	79
1E-6 M	103	118	84	89	106	85	110	127	93	116	113	81
1E-7 M	88	115					96	100				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	12	3,7	88	6	35	4,7	65	6
1E-5 M	53	10,7	47	6	85	9,3	15	6
1E-6 M	97	13,6	3	6	107	16,6	-7	6
1E-7 M	101	19,1	-1	2	98	2,5	2	2

ETYA / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	41	45	40	39	42	57	278	273	287	243	260	321
1E-5 M	52	57	65	36	55	52	245	197	183	208	230	237
1E-6 M	77	70	74	80	94	80	140	137	127	123	144	150
1E-7 M	90	117	90	108	104	96	122	111	118	110	123	112
1E-8 M	90	101	104				98	99	109			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	44	6,6	56	6	277	26,6	-177	6
1E-5 M	53	9,5	47	6	217	24,4	-117	6
1E-6 M	79	8,1	21	6	137	10,2	-37	6
1E-7 M	101	11,0	-1	6	116	5,9	-16	6
1E-8 M	99	7,1	1	3	102	6,0	-2	3

ETYA / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	371	426	420	446	345	403
1E-5 M	119	167	241	189	196	233
1E-6 M	114	110	110	131	140	113
1E-7 M	95	101				

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	402	37,6	-302	6
1E-5 M	191	44,6	-91	6
1E-6 M	119	12,6	-19	6
1E-7 M	98	4,3	2	2

Tabelle 19a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ETYA.

BW 755C / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	69	75	60	72	64	73	16	11	13	13	11	13
1E-5 M	93	64	82	94	86	96	27	23	27	41	19	26
1E-6 M	95	103	111	96	118	96	61	55	65	63	55	75
1E-7 M	96	97	107	107	112	108	80	88	87	105	93	114
1E-8 M	96		98	101			102		100	96		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	69	5,8	31	6	13	1,9	87	6
1E-5 M	86	12,0	14	6	27	7,3	73	6
1E-6 M	103	9,3	-3	6	62	7,1	38	6
1E-7 M	105	6,7	-5	6	94	12,6	6	6
1E-8 M	99	2,8	1	3	99	3,3	1	3

BW 755C / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	23	35	15	15	21	21	6	11	5	4	3	9
1E-5 M	87	72	57	80	71	63	78	86	91	79	79	94
1E-6 M	119	97	90	91	76	78	96	99	98	95	87	121
1E-7 M	110	93	98	93	75	82	94	101	97	94	86	97

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	22	7,5	78	6	6	3,1	94	6
1E-5 M	72	10,9	28	6	85	6,9	15	6
1E-6 M	92	15,6	8	6	99	11,5	1	6
1E-7 M	92	12,4	8	6	95	5,0	5	6

BW 755C / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	3	2	3	2	3	3	15	16	18	15	13	19
1E-5 M	10	18	18	23	14	25	30	28	37	41	25	44
1E-6 M	55	75	63	77	59	67	52	60	52	73	53	63
1E-7 M	80	111	112	97	106	111	81	106	89	94	89	117
1E-8 M	85		108	98			99		97	102		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	3	0,2	97	6	16	2,3	84	6
1E-5 M	18	5,4	82	6	34	7,6	66	6
1E-6 M	66	8,8	34	6	59	8,5	41	6
1E-7 M	103	12,3	-3	6	96	13,2	4	6
1E-8 M	97	11,4	3	3	100	2,8	0	3

BW 755C / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	8	13	7	7	6	15	24	24	25	31	39	36
1E-5 M	71	82	73	71	70	66	84	112	67	97	86	94
1E-6 M	93	105	93	90	81	99	82	111	102	100	92	92
1E-7 M	86	97	93	86	95	109	86	105	95	90	98	92

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	9	3,6	91	6	30	6,3	70	6
1E-5 M	72	5,5	28	6	90	14,8	10	6
1E-6 M	94	8,4	6	6	97	9,8	3	6
1E-7 M	95	8,5	5	6	94	6,8	6	6

BW 755C / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	24	12	14	14	21	13	102	93	86	84	107	78
1E-5 M	50	33	30	48	42	46	117	86	114	114	107	107
1E-6 M	61	69	66	64	61	73	105	108	98	116	125	114
1E-7 M	97	88	92	113	86	110	116	90	91	117	105	100
1E-8 M	108		112	102			104		98	106		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	16	5,0	84	6	92	11,1	8	6
1E-5 M	41	8,4	59	6	108	11,2	-8	6
1E-6 M	66	4,4	34	6	111	9,2	-11	6
1E-7 M	97	11,3	3	6	103	11,8	-3	6
1E-8 M	107	4,6	-7	3	103	3,9	-3	3

BW 755C / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	219	203	218	229	237	290
1E-5 M	144	146	125	146	130	140
1E-6 M	104	106	101	102	124	108
1E-7 M	100	109	111	97	108	77

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	232	30,3	-132	6
1E-5 M	138	8,9	-38	6
1E-6 M	107	8,7	-7	6
1E-7 M	100	12,6	0	6

Tabelle 20a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch BW 755C.

NDGA / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-MERTES												
1E-4 M	180	182	137	183	153	144	46	33	54	37	34	54
1E-5 M	56	52	58	56	48	61	26	19	24	20	18	29
1E-6 M	94	116	99	94	115	104	94	102	99	78	83	111
1E-7 M	100	107	104	100	121	102	98	105	110	81	102	103
1E-8 M			100	97					105	103		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	163	20,8	-63	6	43	9,7	57	6
1E-5 M	55	4,7	45	6	23	4,5	77	6
1E-6 M	104	10,1	-4	6	95	12,1	5	6
1E-7 M	106	7,8	-6	6	100	10,2	0	6
1E-8 M	98	2,0	2	2	104	1,2	-4	2

NDGA / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-MERTES												
1E-4 M	20	11	8	11	21	8	63	35	51	63	65	50
1E-5 M	5	5	8	5	5	7	48	36	55	44	42	47
1E-6 M	84	94	112	87	88	115	73	76	71	67	69	73
1E-7 M	116	106	119	102	110	103	83	82	99	107	99	101
1E-8 M			100	102					103	93		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	13	5,7	87	6	54	11,6	46	6
1E-5 M	6	1,4	94	6	45	6,4	55	6
1E-6 M	96	13,5	4	6	72	3,4	28	6
1E-7 M	109	7,0	-9	6	95	10,3	5	6
1E-8 M	101	1,6	-1	2	98	7,6	2	2

NDGA / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-MERTES												
1E-4 M	67	54	53	52	45	46	330	355	246	316	286	252
1E-5 M	65	50	49	57	43	43	54	27	53	58	55	49
1E-6 M	76	87	103	93	69	99	104	104	112	114	108	123
1E-7 M	90	91	101	100	105	110	115	84	110	108	89	111
1E-8 M			105	97					106	98		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	53	8,2	47	6	297	43,8	-197	6
1E-5 M	51	8,4	49	6	49	11,2	51	6
1E-6 M	88	13,1	12	6	111	7,2	-11	6
1E-7 M	99	8,0	1	6	103	12,9	-3	6
1E-8 M	101	5,5	-1	2	102	5,5	-2	2

NDGA / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-MERTES												
1E-4 M	14	12	14				5	6	10			
1E-5 M	34	23	27	31	29	37	5	6	10	10	4	9
1E-6 M	51	53	49	51	53	57	43	37	39	26	43	27
1E-7 M	87	88	90	110	78	88	88	108	85	123	83	96
1E-8 M		96	121					129	93			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	13	1,1	87	3	7	2,4	93	3
1E-5 M	30	5,0	70	6	7	2,7	93	6
1E-6 M	53	2,6	47	6	36	7,6	64	6
1E-7 M	90	10,8	10	6	97	15,9	3	6
1E-8 M	108	17,6	-8	2	111	25,6	-11	2

NDGA / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-MERTES												
1E-4 M	5	9	9				12	14	12			
1E-5 M	3	12	18	9	3	9	30	16	19	24	32	27
1E-6 M	31	46	47	23	35	31	65	72	50	34	66	76
1E-7 M	90	110	92	97	91	89	109	97	95	83	97	99
1E-8 M		115	103					105	96			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	8	2,8	92	3	13	1,1	87	3
1E-5 M	9	5,4	91	6	25	6,2	75	6
1E-6 M	35	9,6	65	6	61	16,0	39	6
1E-7 M	95	8,0	5	6	97	8,5	3	6
1E-8 M	109	8,2	-9	2	100	6,3	0	2

NDGA / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-MERTES						
1E-4 M	236	201	227			
1E-5 M	250	167	185	265	246	200
1E-6 M	152	97	145	121	148	129
1E-7 M	99	84	103	110	100	93
1E-8 M		118	94			

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	221	18,2	-121	3
1E-5 M	219	39,9	-119	6
1E-6 M	132	20,9	-32	6
1E-7 M	98	9,1	2	6
1E-8 M	106	17,3	-6	2

Tabelle 21a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch NDGA.

MK 447 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	101	107	119	97	110	101	43	45	40	33	33	41
1E-5 M	84	102	102	100	80	97	66	64	72	75	73	73
1E-6 M	87	107	94	93	86	108	83	79	76	83	97	92
1E-7 M	91	101	100	94	92	108	109	88	84	90	122	103
1E-8 M			100	99					91	118		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	106	8,0	-6	6	39	5,3	61	6
1E-5 M	94	9,6	6	6	70	4,4	30	6
1E-6 M	96	9,8	4	6	85	7,9	15	6
1E-7 M	98	6,4	2	6	99	14,7	1	6
1E-8 M	100	0,7	0	2	105	19,2	-5	2

MK 447 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	22	18	21	20	24	10	99	107	115	130	90	100
1E-5 M	36	59	58	60	58	78	79	78	94	95	91	71
1E-6 M	61	75	93	89	96	113	97	85	92	99	116	95
1E-7 M	75	80	94	89	114	115	113	89	84	85	113	105
1E-8 M			93	99					112	97		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	19	4,7	81	6	107	14,0	-7	6
1E-5 M	58	13,2	42	6	85	10,2	15	6
1E-6 M	88	17,9	12	6	97	10,3	3	6
1E-7 M	95	16,8	5	6	98	13,7	2	6
1E-8 M	96	3,8	4	2	105	10,6	-5	2

MK 447 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	234	275	287	282	223	234	136	90	78	76	113	97
1E-5 M	83	143	107	103	98	110	89	120	125	120	129	107
1E-6 M	92	96	124	128	88	107	97	99	123	112	130	121
1E-7 M	70	90	117	106	111	117	126	114	95	105	103	116
1E-8 M			108	93					102	100		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	256	28,4	-156	6	98	22,3	2	6
1E-5 M	107	19,9	-7	6	115	15,0	-15	6
1E-6 M	106	16,9	-6	6	114	13,3	-14	6
1E-7 M	102	18,5	-2	6	110	11,2	-10	6
1E-8 M	101	10,3	-1	2	101	1,3	-1	2

MK 447 / PMN

	PEAK I						PEAK II					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	137	126	149	113	115	124	107	92	93	115	108	105
1E-5 M	133	130	151	113	112	108	108	97	93	98	108	98
1E-6 M	100	100	116	99	117	88	105	111	76	107	109	97
1E-7 M	97	97	109	97			94	106	100	109		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	127	13,7	-27	6	103	8,9	-3	6
1E-5 M	124	16,6	-24	6	100	6,2	0	6
1E-6 M	103	11,2	-3	6	101	13,0	-1	6
1E-7 M	100	5,8	0	4	102	6,5	-2	4

MK 447 / PMN

	PEAK III						PEAK IV					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	123	117	152	120	107	135	121	100	127	128	110	122
1E-5 M	99	109	121	112	109	108	96	96	120	98	97	95
1E-6 M	99	110	98	112	109	95	107	93	89	96	114	102
1E-7 M	103	105	113	106			106	85	124	92		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	126	15,8	-26	6	118	11,0	-18	6
1E-5 M	110	7,2	-10	6	100	9,6	0	6
1E-6 M	104	7,2	-4	6	100	9,5	0	6
1E-7 M	106	4,2	-6	4	102	17,0	-2	4

MK 447 / PMN

	PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ION.-WERTES						
1E-4 M	114	105	100	109	131	104
1E-5 M	105	97	93	102	119	103
1E-6 M	91	89	90	94	111	97
1E-7 M	90	98	92	100		

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	110	11,1	-10	6
1E-5 M	103	9,2	-3	6
1E-6 M	95	8,3	5	6
1E-7 M	95	4,4	5	4

Tabelle 22a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch MK 447.

ZK 31534 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-HERTES												
1E-4 M	79	67	62	65	77	66	51	42	49	43	40	43
1E-5 M	75	95	94	64	79	76	60	76	73	49	50	64
1E-6 M	105	112	100	102	97	89	104	103	93	65	73	82
1E-7 M			99	110	103	101			100	89	92	100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	69	6,9	31	6	45	4,4	55	6
1E-5 M	81	12,0	19	6	62	11,4	38	6
1E-6 M	101	7,8	-1	6	87	15,9	13	6
1E-7 M	103	4,8	-3	4	95	5,4	5	4

ZK 31534 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-HERTES												
1E-4 M	41	39	35	35	40	42	61	43	45	45	43	44
1E-5 M	69	82	55	56	45	52	79	71	67	80	73	83
1E-6 M	98	102	102	73	80	68	115	88	84	100	95	94
1E-7 M			105	93	98	94			86	114	97	97

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	39	3,1	61	6	47	7,1	53	6
1E-5 M	60	13,4	40	6	75	5,9	25	6
1E-6 M	87	15,0	13	6	96	10,9	4	6
1E-7 M	97	5,4	3	4	99	11,5	1	4

ZK 31534 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-HERTES												
1E-4 M	61	47	58	49	47	46	105	89	79	88	86	86
1E-5 M	65	81	72	85	66	62	91	88	95	79	90	91
1E-6 M	91	88	89	101	84	84	108	84	104	85	103	100
1E-7 M			92	112	100	110			98	92	105	106

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	51	6,5	49	6	89	8,8	11	6
1E-5 M	72	9,3	28	6	89	5,4	11	6
1E-6 M	90	6,3	10	6	97	10,4	3	6
1E-7 M	104	9,3	-4	4	100	6,4	0	4

ZK 31534 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-HERTES												
1E-4 M	114	100	96	107	109	89	94	103	102	96	97	94
1E-5 M	78	109	109	98	86	92	92	108	88	101	96	94
1E-6 M	91	106	127	97	99	101	88	105	98	112	100	109

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	104	8,1	-4	4	99	8,8	1	4	97	3,5	3	4
1E-5 M	99	14,5	1	4	94	9,5	6	4	95	5,5	5	4
1E-6 M	106	15,7	-6	4	98	7,2	2	4	105	7,1	-5	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-HERTES								
1E-4 M	121	84	123	95	107	96	105	99
1E-5 M	98	99	110	97	71	129	97	108
1E-6 M	132	107	99	103	93	108	93	110

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	105	19,3	-6	4	102	5,3	-2	4
1E-5 M	101	6,2	-1	4	101	23,9	-1	4
1E-6 M	110	14,6	-10	4	101	9,1	-1	4

Tabelle 23a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 31534.

ZK 32743 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		77	68	83				38	68	56		
1E-5 M	92	73	89	91	93	100	81	76	66	83	82	90
1E-6 M	103	99	90	110	92	105	85	106	82	94	108	99
1E-7 M	96				101	93	96				90	116

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	76	7,4	24	3	54	15,2	46	3
1E-5 M	90	9,0	10	6	80	8,1	20	6
1E-6 M	100	8,0	0	6	96	10,5	4	6
1E-7 M	97	3,6	3	3	101	13,7	-1	3

ZK 32743 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		44	35	36				80	65	81		
1E-5 M	64	66	64	47	55	57	73	82	82	100	83	92
1E-6 M	84	91	89	81	75	85	92	107	105	109	88	89
1E-7 M	103				97	103	100				97	85

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	38	5,1	62	3	75	9,3	25	3
1E-5 M	59	7,1	41	6	85	9,5	15	6
1E-6 M	84	5,9	16	6	98	9,6	2	6
1E-7 M	101	3,5	-1	3	94	7,9	6	3

ZK 32743 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTE												
1E-4 M		83	72	76				119	93	99		
1E-5 M	86	89	75	62	71	86	108	101	81	106	81	97
1E-6 M	102	94	91	108	92	95	85	113	96	107	95	104
1E-7 M	80				106	99	87				111	90

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	77	5,5	23	3	104	13,6	-4	3
1E-5 M	78	10,6	22	6	96	12,1	4	6
1E-6 M	97	6,7	3	6	100	10,1	0	6
1E-7 M	95	13,5	5	3	96	13,1	4	3

ZK 32743 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	102	90	93	103	101	95	97	99	105	105	104	94
1E-5 M	127	90	93	107	97	103	90	92	100	94	107	97
1E-6 M	116	96	94	108	92	110	103	91	96	87	110	111

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	97	6,7	3	4	98	2,5	2	4	102	5,3	-2	4
1E-5 M	104	17,0	-4	4	96	5,6	4	4	99	6,0	1	4
1E-6 M	104	10,6	-4	4	99	9,1	1	4	101	11,6	-1	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	94	111	101	92	99	97	110	93
1E-5 M	109	129	98	98	91	99	109	107
1E-6 M	89	97	93	110	86	83	112	111

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	99	8,8	1	4	100	7,2	0	4
1E-5 M	108	14,8	-8	4	101	8,5	-1	4
1E-6 M	97	9,3	3	4	98	15,5	2	4

Tabelle 24a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 32743.

ZK 33612 / Macroph.

	START Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	PEAK I Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	117	99	105	93	95		44	40	42	45	47	
1E-5 M	68	95	101	91	103	69	54	62	72	58	48	78
1E-6 M	90	101	108	97	105	77	72	84	89	68	53	82
1E-7 M		119	97	102		85		88	102	97		109

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	102	9,7	-2	5	44	2,6	56	5
1E-5 M	88	15,6	12	6	62	11,4	38	6
1E-6 M	96	11,4	4	6	74	13,1	26	6
1E-7 M	101	14,2	-1	4	99	8,8	1	4

ZK 33612 / Macroph.

	PEAK II Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	PEAK III Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	43	42	46	39	48		371	282	258	329	392	
1E-5 M	55	62	52	49	73	52	91	84	87	74	82	84
1E-6 M	99	87	97	62	90	70	96	91	97	85	95	110
1E-7 M		102	101	96		106		100	107	116		115

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	43	3,6	57	5	326	57,1	-226	5
1E-5 M	57	8,9	43	6	84	5,6	16	6
1E-6 M	84	15,1	16	6	95	8,1	5	6
1E-7 M	101	4,1	-1	4	110	7,9	-10	4

ZK 33612 / Macroph.

	PEAK IV Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	PEAK V Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	399	470	403	363	391		615	461	490	411	545	
1E-5 M	70	63	86	92	97	98	95	123	97	96	107	93
1E-6 M	72	96	104	90	86	95	81	101	100	92	97	105
1E-7 M		91	106	100		109		106	129	107		89

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	409	34,8	-309	5	504	78,8	-404	5
1E-5 M	84	14,6	16	6	102	11,2	-2	6
1E-6 M	90	11,0	10	6	96	8,2	4	6
1E-7 M	101	7,8	-1	4	108	16,2	-8	4

ZK 33612 / PMN

	PEAK I Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	PEAK II Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	PEAK III Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	97	112	97	101	92	110	102	98	106	93	96	92
1E-5 M	99	112	94	96	102	119	104	93	109	126	89	87
1E-6 M	85	120	99	95	106	124	95	94	122	131	90	98

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	102	7,2	-2	4	100	7,6	0	4	97	6,4	3	4
1E-5 M	100	7,7	0	4	105	10,8	-5	4	103	18,4	-3	4
1E-6 M	100	14,4	0	4	105	14,0	-5	4	110	19,3	-10	4

	PEAK IV Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	PEAK V Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	103	122	98	91	130	100	78	97
1E-5 M	104	121	91	94	130	79	94	102
1E-6 M	91	140	92	96	99	135	82	98

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	104	13,1	-4	4	101	21,3	-1	4
1E-5 M	102	13,5	-2	4	101	21,3	-1	4
1E-6 M	105	23,7	-5	4	104	22,7	-4	4

Tabelle 25a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 33612.

ZK 34228 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	71	67	58			70	24	31	37			29
1E-5 M	76	78	97	80	90	84	36	48	44	48	48	44
1E-6 M	84	80	97	80	95	90	99	68	82	70	65	60
1E-7 M		95	117	87	102	107		82	93	75	96	107

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	66	6,0	34	4	30	5,3	70	4
1E-5 M	84	8,0	16	6	45	4,9	55	6
1E-6 M	87	7,5	13	6	74	14,4	26	6
1E-7 M	102	11,6	-2	5	91	12,5	9	5

ZK 34228 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	9	9	9			11	60	68	61			74
1E-5 M	27	29	31	22	30	33	92	81	71	72	87	82
1E-6 M	71	76	75	59	56	70	104	109	87	89	100	96
1E-7 M		102	106	83	85	97		105	116	92	109	95

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	9	0,9	91	4	66	6,7	34	4
1E-5 M	29	3,7	71	6	81	8,1	19	6
1E-6 M	68	8,3	32	6	97	8,5	3	6
1E-7 M	94	10,5	6	5	104	10,1	-4	5

ZK 34228 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	50	56	54			80	85	99	101			104
1E-5 M	54	60	70	86	80	87	81	101	97	113	101	89
1E-6 M	99	107	85	100	95	107	103	117	107	91	112	97
1E-7 M		122	108	99	100	102		120	97	91	105	105

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	60	13,2	40	4	97	8,2	3	4
1E-5 M	73	13,6	27	6	97	11,1	3	6
1E-6 M	99	8,5	1	6	105	9,5	-5	6
1E-7 M	106	9,6	-6	5	104	10,7	-4	5

ZK 34228 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	107	107	108	90	111	96	87	98	104	88	83	105
1E-5 M	103	104	105	93	111	101	89	94	103	94	85	103
1E-6 M	107	90	95	102	114	101	87	98	113	88	85	101

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	103	8,5	-3	4	98	10,1	2	4	95	11,1	5	4
1E-5 M	101	5,6	-1	4	99	9,8	1	4	96	8,6	4	4
1E-6 M	99	7,5	1	4	100	11,2	0	4	97	12,9	3	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	92	95	86	103	100	101	96	105
1E-5 M	84	94	89	110	102	107	84	101
1E-6 M	100	94	103	106	105	74	104	93

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	94	6,9	6	4	100	3,5	0	4
1E-5 M	94	11,4	6	4	99	10,1	1	4
1E-6 M	101	5,2	-1	4	94	14,3	6	4

Tabelle 26a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 34228.

ZK 37442 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		212	174	241	179			26	24	29	29	
1E-5 M	103	137	133	100	105	96	61	70	77	66	48	47
1E-6 M	101	112	107	104	97	101	91	75	93	100	83	71
1E-7 M	99	87				96	95	89				100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	202	31,1	-102	4	27	2,3	73	4
1E-5 M	112	17,9	-12	6	62	11,9	38	6
1E-6 M	104	5,2	-4	6	85	11,3	14	6
1E-7 M	94	6,1	6	3	95	5,5	5	3

ZK 37442 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		21	12	12	12			482	307	486	389	
1E-5 M	50	39	64	45	51	48	64	75	94	80	82	84
1E-6 M	89	83	113	91	96	103	95	82	100	104	106	97
1E-7 M	90	95				99	97	96				103

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	14	4,8	86	4	416	85,5	-316	4
1E-5 M	50	8,2	50	6	80	10,1	20	6
1E-6 M	96	10,7	4	6	97	8,6	3	6
1E-7 M	95	4,4	5	3	99	4,2	1	3

ZK 37442 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		1629	1150	1784	1364			240	284	288	225	
1E-5 M	98	84	111	81	88	86	101	74	82	107	102	92
1E-6 M	103	86	105	102	103	98	102	85	77	102	114	92
1E-7 M	98	90				109	95	96				111

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	1482	281,0	-1392	4	259	31,5	-159	4
1E-5 M	91	11,4	9	6	93	12,8	7	6
1E-6 M	100	6,9	0	6	95	13,3	5	6
1E-7 M	99	9,2	1	3	101	8,8	-1	3

ZK 37442 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	27	18	23	22	11	8	15	10	9	10	11	13
1E-5 M	98	125	92	96	97	108	95	92	120	103	98	96
1E-6 M	101	140	89	95	107	117	105	96	111	107	106	108

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	22	3,8	78	4	11	3,3	89	4	11	1,5	89	4
1E-5 M	103	15,0	-3	4	98	7,0	2	4	104	10,8	-4	4
1E-6 M	105	22,9	-6	4	105	8,7	-6	4	108	2,5	-8	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	637	432	474	535	224	203	219	231
1E-5 M	103	113	108	94	120	103	96	92
1E-6 M	76	91	104	99	103	91	102	85

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	520	88,8	-420	4	219	11,7	-119	4
1E-5 M	104	8,1	-4	4	103	12,5	-3	4
1E-6 M	92	12,2	8	4	95	8,5	5	4

Tabelle 27a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 37442.

ZK 38997 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	81	63	53	83	75		32	45	29	34	20	
1E-5 M	91	84	60	76	89		44	38	38	40	32	
1E-6 M	90	94	116	95	98	100	75	58	66	58	66	70
1E-7 M	116		99	102		101	117		95	95		100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	71	12,6	29	5	32	9,1	68	5
1E-5 M	80	12,5	20	5	38	4,4	62	5
1E-6 M	99	9,2	1	6	65	6,6	35	6
1E-7 M	105	7,6	-5	4	102	10,1	-2	4

ZK 38997 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	5	6	8	8	9		82	64	85	66	71	
1E-5 M	12	11	12	10	21		66	65	94	66	72	
1E-6 M	42	57	67	42	52	61	83	70	109	79	83	84
1E-7 M	92		98	97		101	106		104	98		98

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	7	1,4	93	5	74	9,2	26	5
1E-5 M	13	4,7	87	5	73	12,4	27	5
1E-6 M	54	10,2	46	6	84	13,0	16	6
1E-7 M	97	3,8	3	4	101	4,2	-1	4

ZK 38997 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	64	77	63	60	49		118	102	106	86	97	
1E-5 M	57	64	69	55	57		78	94	90	116	100	
1E-6 M	78	84	75	75	74	85	95	96	87	92	91	94
1E-7 M	124		93	105		118	88		74	96		94

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	63	10,0	37	5	102	12,0	-2	5
1E-5 M	60	6,1	40	5	95	14,1	5	5
1E-6 M	78	4,7	22	6	92	3,4	8	6
1E-7 M	110	13,6	-10	4	88	10,1	12	4

ZK 38997 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	86	98	103	97	81	104	103	100	83	99	105	101
1E-5 M	98	116	105	108	91	101	105	88	89	91	107	104
1E-6 M	96	110	96	107	88	100	100	102	86	97	98	101

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	96	7,2	4	4	97	10,6	3	4	97	9,8	3	4
1E-5 M	107	7,5	-7	4	96	8,2	4	4	98	8,7	2	4
1E-6 M	102	7,2	-2	4	98	6,5	2	4	96	6,6	4	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	87	113	103	94	105	91	89	98
1E-5 M	91	104	100	98	107	94	103	97
1E-6 M	94	81	102	103	115	89	96	102

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	99	11,3	1	4	96	7,4	4	4
1E-5 M	98	5,4	2	4	100	6,0	0	4
1E-6 M	95	10,2	5	4	100	10,9	0	4

Tabelle 28a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 38997.

ZK 73705 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	91	105	95	98			26	24	29	29		
1E-5 M	101	113	102	96	104	96	34	40	44	45	51	56
1E-6 M	98	108	95	99	98	105	54	61	61	70	83	76
1E-7 M	99	101			102	100	98	95			100	109

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	97	6,1	3	4	27	2,3	73	4
1E-5 M	102	6,3	-2	6	45	7,7	55	6
1E-6 M	101	5,2	-1	6	67	11,0	33	6
1E-7 M	101	1,4	-1	4	100	5,9	0	4

ZK 73705 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	8	8	20	23			64	68	60	67		
1E-5 M	11	18	40	40	43	45	71	77	69	79	83	80
1E-6 M	59	45	76	76	79	67	69	81	79	95	96	106
1E-7 M	100	99			106	93	95	93			102	104

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	15	7,8	85	4	65	3,5	35	4
1E-5 M	33	14,5	67	6	77	5,4	23	6
1E-6 M	67	13,1	33	6	88	13,7	12	6
1E-7 M	99	5,2	1	4	98	5,3	2	4

ZK 73705 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	69	85	64	69			94	100	94	102		
1E-5 M	75	95	86	83	88	73	91	104	101	122	104	106
1E-6 M	86	100	101	105	92	80	96	95	105	107	108	105
1E-7 M	102	115			98	94	101	100			101	93

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	72	8,9	28	4	97	4,1	3	4
1E-5 M	83	8,1	17	6	105	10,1	-5	6
1E-6 M	94	9,9	6	6	103	5,8	-3	6
1E-7 M	102	9,1	-2	4	99	4,0	1	4

ZK 73705 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	76	98	101	97	82	89	95	114	82	88	105	104
1E-5 M	102	107	107	104	102	100	102	103	93	95	109	102
1E-6 M	97	111	107	95	99	96	108	96	88	92	111	94

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	93	11,5	7	4	95	13,8	5	4	95	11,2	5	4
1E-5 M	105	2,5	-5	4	102	1,2	-2	4	100	7,6	0	4
1E-6 M	103	8,0	-3	4	100	5,5	0	4	96	10,3	4	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	85	93	105	127	89	89	111	106
1E-5 M	92	104	90	106	93	77	131	111
1E-6 M	88	101	97	92	86	83	115	102

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	103	18,3	-3	4	99	11,3	1	4
1E-5 M	98	7,8	2	4	103	23,2	-3	4
1E-6 M	94	5,8	6	4	97	14,9	3	4

Tabelle 29 a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch Nimesulid ZK 73705.

ZK 91182 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		76	72	86				33	61	59		
1E-5 M	89	71	94	86	88	91	65	58	65	74	71	70
1E-6 M	111	106	104	101	91	99	79	87	85	97	96	96
1E-7 M	112				96	103	92				96	97

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	78	7,2	22	3	51	15,7	49	3
1E-5 M	86	7,9	14	6	67	5,6	33	6
1E-6 M	102	6,7	-2	6	90	7,6	10	6
1E-7 M	104	7,8	-4	3	95	3,0	5	3

ZK 91182 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		41	34	35				60	78	84		
1E-5 M	63	56	52	48	53	56	90	67	88	98	94	92
1E-6 M	81	89	104	72	76	82	96	103	98	108	96	89
1E-7 M	86				88	110	95				101	103

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	36	3,9	64	3	74	12,8	26	3
1E-5 M	55	5,0	45	6	88	10,8	12	6
1E-6 M	84	11,4	16	6	98	6,5	2	6
1E-7 M	94	13,3	6	3	100	4,1	0	3

ZK 91182 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		47	71	69				97	95	94		
1E-5 M	64	57	90	82	83	82	96	78	108	95	83	101
1E-6 M	88	105	119	95	92	98	85	113	96	107	95	112
1E-7 M	88				107	93	87				97	100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	62	13,2	38	3	96	1,7	4	3
1E-5 M	76	12,8	24	6	93	11,2	7	6
1E-6 M	100	11,2	0	6	101	11,1	-1	6
1E-7 M	96	9,7	4	3	94	6,8	6	3

ZK 91182 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	101	105	104	103	96	93	106	103	97	94	114	101
1E-5 M	81	95	95	114	95	110	103	106	94	92	99	104
1E-6 M	84	91	115	113	100	95	104	99	99	101	98	102

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	103	1,8	-3	4	99	6,4	1	4	101	9,0	-1	4
1E-5 M	96	13,3	4	4	103	6,0	-3	4	97	5,3	3	4
1E-6 M	101	15,8	-1	4	99	3,7	1	4	100	1,5	0	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	104	95	105	95	100	98	77	133
1E-5 M	108	98	130	103	105	95	97	110
1E-6 M	96	98	124	98	104	93	105	120

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	100	5,9	0	4	102	23,0	-2	4
1E-5 M	110	14,3	-10	4	102	7,5	-2	4
1E-6 M	104	13,5	-4	4	105	11,0	-5	4

Tabelle 30a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 91182.

ZK 91288 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	73					86	39					29
1E-5 M	85	90	96			94	34	30	27			34
1E-6 M	123	101	100	84	107	101	39	33	31	42	44	48
1E-7 M	106	94	104	94	94	99	43	51	51	53	56	49
1E-8 M		98	105	101	90			89	94	107	106	0

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	79	9,5	21	2	34	7,2	66	2
1E-5 M	91	4,8	9	4	31	3,7	69	4
1E-6 M	103	12,5	-3	6	39	6,6	61	6
1E-7 M	98	5,5	2	6	51	4,5	49	6
1E-8 M	99	6,3	1	4	79	45,0	21	5

ZK 91288 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	13					15	130					151
1E-5 M	8	11	10			17	103	89	111			103
1E-6 M	9	28	21	17	35	18	98	99	120	101	97	94
1E-7 M	35	55	43	53	61	52	96	108	103	88	99	99
1E-8 M		96	100	101	92			105	111	98	98	

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	14	1,4	86	2	141	14,4	-41	2
1E-5 M	11	3,7	89	4	101	9,2	-1	4
1E-6 M	21	9,2	79	6	102	9,3	-2	6
1E-7 M	50	9,3	50	6	99	6,6	1	6
1E-8 M	97	4,0	3	4	103	6,0	-3	4

ZK 91288 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	320					204	69					89
1E-5 M	103	103	98			91	134	115	156			122
1E-6 M	103	118	98	92	126	94	137	117	162	123	141	122
1E-7 M	96	107	94	73	109	95	117	102	142	110	116	113
1E-8 M		101	110	79	108			107	112	93	87	

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	262	82,4	-162	2	79	14,0	21	2
1E-5 M	99	5,7	1	4	132	18,1	-32	4
1E-6 M	105	14,0	-5	6	134	16,6	-34	6
1E-7 M	96	12,8	4	6	117	13,8	-17	6
1E-8 M	99	14,3	1	4	100	11,7	0	4

ZK 91288 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	23	18	20	22	8	17	19	26	16	20	24	20
1E-5 M	104	88	95	100	83	91	89	88	93	81	70	99
1E-6 M	135	100	94	96	109	101	100	96	93	111	91	102

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	21	2,1	79	4	17	7,3	83	4	20	3,5	80	4
1E-5 M	97	7,0	3	4	88	3,6	12	4	86	12,8	14	4
1E-6 M	106	19,4	-6	4	102	5,3	-2	4	99	8,8	1	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	89	157	145	129	202	196	246	221
1E-5 M	108	118	120	107	129	130	151	138
1E-6 M	112	99	94	99	120	92	119	92

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	130	29,6	-30	4	216	22,6	-116	4
1E-5 M	113	6,8	-13	4	137	10,3	-37	4
1E-6 M	101	7,6	-1	4	106	15,8	-6	4

Tabelle 31a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 91288.

ZK 91697 / Macroph.

	START						PEAK I					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		158	194	151	144			39	25	27	36	
1E-5 M		100	78	100	101	110		53	38	29	41	40
1E-6 M	85	94	83	105	91	94	54	43	58	54	52	44
1E-7 M	109		104			92	98		102			80

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	162	22,1	-62	4	32	6,7	68	4
1E-5 M	98	11,9	2	5	40	8,6	60	5
1E-6 M	92	7,7	8	6	51	6,1	49	6
1E-7 M	101	9,0	-1	3	93	11,8	7	3

ZK 91697 / Macroph.

	PEAK II						PEAK III					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		23	8	20	8			340	329	296	265	
1E-5 M		20	17	24	34	21		70	71	86	75	81
1E-6 M	30	32	41	44	37	39	71	60	80	90	80	83
1E-7 M	83		102			92	99		95			103

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	15	7,8	85	4	307	34,1	-207	4
1E-5 M	23	6,3	77	5	76	6,9	24	5
1E-6 M	37	5,2	63	6	77	10,4	23	6
1E-7 M	92	9,6	8	3	99	3,9	1	3

ZK 91697 / Macroph.

	PEAK IV						PEAK V					
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.5	Vers.6
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M		784	576	609	522			741	448	454	414	
1E-5 M		97	77	78	81	77		101	95	113	110	99
1E-6 M	72	71	70	77	79	79	102	99	103	101	129	108
1E-7 M	96		99			102	104		110			83

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZAHL VERS.
1E-4 M	622	113,3	-522	4	514	151,9	-414	4
1E-5 M	82	8,5	18	5	104	7,7	-4	5
1E-6 M	75	4,0	25	6	107	11,1	-7	6
1E-7 M	99	2,7	1	3	99	14,0	1	3

ZK 91697 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	16	34	17	19	15	9	18	21	22	12	23	22
1E-5 M	49	81	46	48	53	34	52	53	51	37	58	49
1E-6 M	101	115	93	109	101	93	102	100	104	102	103	108

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	21	8,8	79	4	16	5,4	84	4	20	5,1	80	4
1E-5 M	56	16,5	44	4	48	9,2	52	4	49	8,8	51	4
1E-6 M	104	9,6	-4	4	99	4,2	1	4	104	2,5	-4	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	142	114	132	130	208	244	194	186
1E-5 M	124	129	110	103	140	185	152	144
1E-6 M	99	112	90	96	98	133	88	92

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	130	11,6	-30	4	208	25,5	-108	4
1E-5 M	116	11,8	-16	4	155	20,6	-55	4
1E-6 M	99	9,1	1	4	103	20,6	-3	4

Tabelle 32a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 91697.

ZK 98062 / Macroph.

	START				PEAK I				PEAK II			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	70	86	63	79	25	27	36	39	12	12	21	12
1E-5 M	95	86	100	82	57	59	73	73	39	41	73	38
1E-6 M	100	101	104	121	91	98	83	107	78	97	85	82
1E-7 M	112		88	113	115		105	105	102		103	87

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	74	10,3	26	4	32	6,7	68	4	14	4,8	86	4
1E-5 M	91	8,2	9	4	65	8,8	35	4	48	16,8	52	4
1E-6 M	107	9,8	-7	4	95	10,2	5	4	86	8,5	14	4
1E-7 M	104	14,0	-4	3	108	5,6	-8	3	98	8,7	2	3

ZK 98062 / Macroph.

	III				PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	77	72	89	76	76	70	75	76	102	99	91	145
1E-5 M	86	93	103	90	89	83	96	92	90	102	108	109
1E-6 M	113	111	94	100	114	107	95	116	99	96	83	120
1E-7 M	96		103	108	102		104	120	90		92	106

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	79	7,4	21	4	74	2,9	26	4	109	24,6	-9	4
1E-5 M	93	7,4	7	4	90	5,4	10	4	103	8,9	-3	4
1E-6 M	105	8,9	-5	4	108	9,3	-8	4	100	15,0	0	4
1E-7 M	103	6,0	-3	3	109	10,3	-9	3	96	9,1	4	3

ZK 98062 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	99	83	100	110	111	92	104	103	113	104	97	89
1E-5 M	88	115	94	95	96	97	106	95	100	91	96	92
1E-6 M	110	107	99	98	101	102	99	98	100	97	102	99

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	98	11,4	2	4	102	8,0	-2	4	101	10,2	-1	4
1E-5 M	98	11,9	2	4	98	4,9	2	4	95	4,1	5	4
1E-6 M	104	5,8	-4	4	100	2,1	0	4	99	2,1	1	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	95	101	88	115	87	92	98	113
1E-5 M	98	111	94	110	90	107	103	105
1E-6 M	95	105	97	105	87	110	97	105

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	100	11,7	0	4	98	11,3	2	4
1E-5 M	103	8,6	-3	4	101	7,5	-1	4
1E-6 M	101	5,3	-1	4	100	10,1	0	4

Tabelle 33a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 98062.

ZK 98063 / Macroph.

	START				PEAK I				PEAK II			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	58	84	82	81	51	38	53	36	33	21	35	23
1E-5 M	70	90	101	88	79	58	81	71	67	40	55	54
1E-6 M	87	97	104	103	104	93	105	102	105	97	99	100
1E-7 M	104		101	97	91		99	82	92		99	100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	76	11,9	24	4	44	8,6	56	4	28	7,2	72	4
1E-5 M	87	12,8	13	4	72	10,5	28	4	54	11,0	46	4
1E-6 M	97	7,7	3	4	101	5,4	-1	4	101	3,5	-1	4
1E-7 M	101	3,1	-1	3	91	8,6	9	3	97	4,1	3	3

ZK 98063 / Macroph.

	III				PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ZYM.-WERTES												
1E-4 M	88	65	97	91	87	86	76	99	87	86	76	99
1E-5 M	85	88	93	90	85	100	90	82	85	100	90	82
1E-6 M	93	100	102	97	119	101	101	110	119	101	101	110
1E-7 M	101		103	98	103		101	92	103		101	92

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	86	14,0	15	4	87	9,3	13	4	87	9,3	13	4
1E-5 M	89	3,5	11	4	89	7,8	11	4	89	7,8	11	4
1E-6 M	98	3,9	2	4	108	8,9	-8	4	108	8,9	-8	4
1E-7 M	101	2,6	-1	3	99	6,1	1	3	99	6,1	1	3

ZK 98063 / PMN

	PEAK I				PEAK II				PEAK III			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES												
1E-4 M	85	104	102	98	100	93	93	105	100	110	105	90
1E-5 M	98	102	108	93	105	96	115	94	103	103	101	99
1E-6 M	126	97	93	87	99	107	107	103	92	100	94	100

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	97	8,5	3	4	98	5,8	2	4	101	8,8	-1	4
1E-5 M	100	6,1	0	4	103	9,6	-3	4	101	2,0	-1	4
1E-6 M	101	17,4	-1	4	104	4,1	-4	4	96	4,1	4	4

	PEAK IV				PEAK V			
	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4	Vers.1	Vers.2	Vers.3	Vers.4
% DES ION.-WERTES								
1E-4 M	84	101	106	79	104	108	87	106
1E-5 M	95	105	108	90	93	92	94	101
1E-6 M	86	109	94	96	90	111	88	105

	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.	MITTELW	STDEV	%HEMM.	ANZ.V.
1E-4 M	93	13,1	7	4	101	9,4	-1	4
1E-5 M	99	8,6	1	4	95	4,0	5	4
1E-6 M	96	9,7	4	4	99	11,5	1	4

Tabelle 34a,b : Ergebnisse der Versuche zur Beeinflussung des AA - Metabolismus bei Makrophagen und Granulocyten durch ZK 98063.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation werden die Ergebnisse von Untersuchungen zum Einfluß verschiedener in vivo antiinflammatorisch wirksamer Methansulfonanilide auf den Arachidonsäuremetabolismus entzündungsrelevanter Zellen mitgeteilt.

An murinen Peritonealmakrophagen, deren sekretorische Leistungen mit Zymosan A stimuliert wurden, wurde der Einfluß von in ihren Angriffspunkten dokumentierten entzündungshemmenden Wirkstoffen und einer Reihe neuartiger Substanzen mit der Grundstruktur eines Methansulfonanilides auf die Synthese und Freisetzung cyclooxygenaseabhängiger sowie lipoxygenaseabhängiger Arachidonatmetaboliten untersucht.

Als weiteres Untersuchungsmodell wurden in einem klinisch-pharmakologischen Versuch Granulocyten aus dem peripheren Blut gesunder Versuchspersonen herangezogen. Hierbei wurde die Wirkung der Methansulfonanilide und andere Substanzen auf die durch Calcium Ionophor A 23187 induzierte Leukotrienfreisetzung untersucht.

Durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der extrahierten Arachidonatmetaboliten und Auswertung am TLC-Analyzer waren qualitative und quantitative Aussagen über den Effekt der Wirkstoffe auf den Arachidonsäuremetabolismus zu erhalten. Die Identifizierung der Eicosanoide erfolgte auf Grund des Vergleiches mit den entsprechenden Referenzsubstanzen.

Zur Charakterisierung der Aussagekraft dieser beiden in-vitro-Modelle wurden zunächst literaturbekannte Substanzen untersucht. Dabei erwiesen sich Indometacin und Pirazolac als Hemmstoffe der Cyclooxygenase (IC_{50}: Indometacin: $3{,}2 \times 10^{-8}$ mol/l; Pirazolac: $3{,}5 \times 10^{-6}$ mol/l). BW 755C, NDGA und ETYA hemmten bei

Makrophagen ebenfalls dosisabhängig die Cyclooxygenase (IC_{50}-Werte: $2,0 \times 10^{-6}$, $3,2 \times 10^{-6}$ bzw. $4,0 \times 10^{-6}$ mol/l), dazu auch die Lipoxygenase mit in dieser Reihenfolge abnehmender Potenz (IC_{50}-Werte: $2,2 \times 10^{-6}$, $7,1 \times 10^{-6}$ bzw. $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l). Benoxaprofen erwies sich als einer der schwächeren Cyclooxygenasehemmstoffe (IC_{50}: $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l), während bei Makrophagen nur bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/l ein geringer Hemmeffekt auf die Lipoxygenaseaktivität nachweisbar war. Das als Radikalfänger bekannte MK 447 zeigte im Gegensatz zu Samenblasenmikrosomenpräparationen im komplexeren Makrophagenmodell keine Stimulation der Prostaglandinsynthese, sondern führte zu einer geringfügigen Unterdrückung der Prostaglandinbildung (IC_{50}: $1,6 \times 10^{-5}$ mol/l).

Die Untersuchungen an Granulocyten ergaben, daß diejenigen Substanzen als Lipoxygenasehemmstoffe charakterisiert werden konnten, für die der qualitative Nachweis des Effektes aus den Untersuchungen am Makrophagenmodell bekannt war. Die inhibitorische Aktivität war bei NDGA am ausgeprägtesten, bei ETYA und BW 755C schwächer (IC_{50}-Werte: 5×10^{-7}, $1,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-5}$ mol/l). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Makrophagenuntersuchungen konnte für Benoxaprofen eine deutlichere Hemmung der Lipoxygenase dokumentiert werden.

Aus der Reihe der neuartigen Methansulfonanilide standen neben Nimesulid und einem strukturanalogen Trifluormethylsulfonanilid (ZK 91288) eine Reihe von systematisch variierten N-(Phenoxyindanyl-)methansulfonamiden zur Verfügung. Es sollte in einem biochemischen Screening untersucht werden, wie sich Strukturmodifikationen auf die in-vitro-Aktivität auswirken und welche Korrelationen zwischen den in-vitro-Daten und den in Untersuchungen am Ganztier dokumentierten entzündungshemmenden Eigenschaften bestehen. Aus Struktur-Wirkungs-Analysen sollte eine Aussage über zwei Einflußgrößen erfolgen:

- Veränderung physikalisch-chemischer und stereochemischer Eigenschaften durch Fluorsubstitution am Phenoxysubstituenten,

- Beziehungen zwischen Indansubstitution und in-vitro-Aktivität.

Als weitere Korrelationsmöglichkeit wurden Aciditätskonstanten und ihre Beeinflussung durch Substitution untersucht.

In beiden untersuchten Reihen konnte als Ergebnis der Einführung einer Ketofunktion in Parastellung zur NH-aciden Methansulfonanilidgruppe eine deutliche Wirkungssteigerung nachgewiesen werden (IC_{50}-Vergleich: Indan ZK 31534: 3,2 x 10^{-5} mol/l ⟶ 1-Oxoindan ZK 34228: 2,8 x 10^{-6} mol/l; Difluorderivate: Indan ZK 37442: 1,0 x 10^{-5} mol/l ⟶ 1-Oxoindan ZK 38997: 1,3 x 10^{-6} mol/l). Aus den Resultaten ist zu schließen, daß wie bei anderen amphiphilen Säuren mit entzündungshemmender Aktivität diejenigen Wirkstoffe sich als potenter erweisen, die unter biologischen Bedingungen in der dissoziierten Form vorliegen können. Im Gegensatz zu den unsubstituierten Indanderivaten (pk_a: 9,3 - 9,4) besitzen die 1-Oxoindane mit einem pk_a-Wert von 7 günstigere Wirkungsvoraussetzungen.

Bei gleicher Grundstruktur führt 2,4-Difluorsubstitution des Phenoxysubstituenten zu einer Aktivitätssteigerung. Dies ist auf die stereochemischen Konsequenzen der Orthosubstitution zurückzuführen, da in der Indanreihe bei Parasubstitution kein nennenswerter Effekt auf die Cyclooxygenaseaktivität nachgewiesen werden kann (IC_{50} ZK 33612: 2,8 x 10^{-5} mol/l). Wie aus anderen Strukturmodifikationen (Flurbiprofen, Diflunisal u.a.) bekannt ist, trägt die so erzielte Nicht-Koplanarität zu einer günstigen Bindungsmöglichkeit des hydrophoben Aromaten bei.

Die Bedeutung der Einführung einer das Methansulfonamid acidifizierenden funktionellen Gruppe geht auch aus einem Vergleich der inhibitorischen Aktivität der 1-Hydroxyindanderivate hervor. 1-Hydroxylierung hat keinen Einfluß auf die NH-Acidität - die IC_{50}-Werte (ZK 32743: 2,5 x 10^{-5} mol/l) unterscheiden sich daher nur unerheblich von den 1-unsubstituierten Indanderivaten; in der difluorsubstituierten Reihe führt sie zu einer Wirkungsverminderung (IC_{50} ZK 91182: 2,0 x 10^{-5} mol/l).

Im Falle einer 1-Oxo-3-hydroxyindanstruktur konnte eine Abschwächung der Aktivität im Vergleich zur ausschließlich vorliegenden 1-Oxosubstitution gezeigt werden (IC_{50}-Werte: ZK 98063: 1,4 x 10^{-5} mol/l; Difluorderivat ZK 98062: 8,9 x 10^{-6} mol/l).

Erhöhung der NH-Acidität durch Einführung einer Trifluormethylgruppe anstelle der Methylgruppe im Sulfonamid führt sowohl in der Nimesulidreihe (IC_{50} Nimesulid: 2,8 x 10^{-6} mol/l; ZK 91288: 1,0 x 10^{-7} mol/l) als auch bei den Indanderivaten (IC_{50} ZK 91697: 6,3 x 10^{-7} mol/l, entsprechendes Methylderivat ZK 37442: 1,0 x 10^{-5} mol/l) zu einer deutlichen Verstärkung der inhibitorischen Aktivität für die PGE_2-Synthese. Mit einem pk_a-Wert von 4,7 ist das Trifluormethylsulfonamid der Indanreihe in seiner Aktivität vergleichbar mit bekannten entzündungshemmenden Wirkstoffen aus der Reihe der Oxicame bzw. Pyrazolidine.

Zum Wirkungsmechanismus der entzündungshemmend-analgetischen Aktivität leistet demnach auch in der untersuchten Reihe der Methansulfonanilide die Cyclooxygenasehemmung einen wesentlichen Beitrag. Die in Zusammenhang mit der Suche nach neuartigen NSE diskutierten Möglichkeiten, über die Cyclooxygenasehemmung hinaus Angriffspunkte solcher Wirkstoffe am Lipoxygenasepathway zu postulieren bzw. Interaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies als möglichen Beitrag zur Entzündungshemmung

nachzuweisen, können für die untersuchten Methansulfonanilide nicht bestätigt werden. Im Makrophagenmodell konnte nur in hohen Konzentrationen (10^{-4} mol/l) für einige Substanzen (ZK 31534, ZK 32743, ZK 34228, ZK 91182, ZK 38997, Nimesulid) eine Hemmung der Synthese und Freisetzung von 5-HETE gezeigt werden (25-50 %). PMN-Lipoxygenasen wurden durch die Methansulfonanilide mit hoher antiinflammatorischer Aktivität nicht beeinflußt. Der relativ schwache Prostaglandinsynthesehemmstoff ZK 37442 sowie die trifluormethylsubstituierten Substanzen (ZK 91288, ZK 91697) hemmten die 5- Lipoxygenase bei gleichzeitiger Stimulation der 15-HETE-Synthese.

Wie für eine Vielzahl von nichtsteroidalen Entzündungshemmern gezeigt wurde, besteht auch bei den hier beschriebenen Substanzen zwischen in-vitro-Parametern zur Cyclooxygenasehemmung und den Ergebnissen am Ganztier zur antiinflammatorischen Aktivität eine Korrelation. Die pharmakologisch am eingehendsten untersuchten Substanzen (ZK 34228 und ZK 38997) sind in ihrem antiinflammatorischen Potential (Adjuvans-Arthritis-Test, Ratte) mit Substanzen hoher Aktivität vergleichbar: In diesem Test erreichte ZK 34228 nahezu die Wirkstärke von Indometacin und Diclofenac; ZK 38997 ist deutlich stärker wirksam.

Wie für die bekannten NSE wurde auch für die Methansulfonanilide eine Prostaglandinsynthesehemmung in einem zellulären System (murine Peritonealmakrophagen) nachgewiesen. Ob dieser Mechanismus eine ausreichende Erklärung für das pharmakologische Profil dieser Substanzen bietet, speziell für die im Vergleich zu klassischen NSE überlegene gastrointestinale Verträglichkeit, bedarf weiterer Untersuchungen.

LITERATURVERZEICHNIS

AHNFELT-RØNNE, I. and ARRIGONI-MARTELLI, E., 1980: A new antiinflammatory compound, timegadine (N-Cyclohexyl-N"-4-[2-methylquinolyl]-N'-2-thiazolylguanidine), which inhibits both prostaglandin and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) formation, Biochem. Pharmacol., 29, 3265-3269.

AHNFELT-RØNNE , I. and ARRIGONI-MARTELLI, E., 1982: Multiple effects of a new anti-inflammatory agent, timegadine, on arachidonic acid release and metabolism in neutrophils and platelets, Biochemical Pharmacology, 31, 2619-2624.

ARAI, Y, SHIMOJI, K., KONNO, M., KONISHI, Y., OKUYAMA, S., IGUCHI, S., HAYASHI, M., MIYAMOTO, T., TODA, M., 1983: Synthesis and 5-Lipoxygenase inhibitory activities of eicosanoid compounds, J. med. Chem., 26, 72-76.

BAUMANN, J., v. BRUCHHAUSEN, F., WURM, G., 1980: Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. Prostaglandins, 20, 627-639.

BIERE, H., SCHRÖDER, E., AHRENS, H., KAPP, J.-F., BÖTTCHER, I., 1982: Nichtsteroidale Entzündungshemmer. 5. Antiphlogistische Pyrazolessigsäuren I, Eur. J. Med. Chem., 34, 27-34.

BLOCK, H.U., TAUBE, C., FÖRSTER, W., 1975: Einfluß blutdrucksenkender Pharmaka auf die in-vitro-Biosynthese der Prostaglandine E und $F_{2\alpha}$ im Kaninchennierenmark, Arch. int. Pharmacodyn., 216, 160-164.

BOCKMANN, R.S., 1981: Prostaglandin production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages: synthesis dependent on in vitro culture conditions, Prostaglandins, 21, 9-31.

BÖTTCHER, I., 1981: Wirkstoffinformation 'Methansulfonanilide', Dokument der Schering AG.

BONNEY, R.J., WIGHTMAN, P.D., DAVIES, Ph., SADOWSKI, S.J., KUEHL, F.A., HUMES, J.L., 1978a: Regulation of Prostaglandin Synthesis and of the Selective Release of Lysosomal Hydrolases by Mouse Peritoneal Macrophages, Biochem. J., 3, 176, 433-442.

BONNEY, R.J., DAVIES, P., KUEHL, Jr., F., HUMES, J.L., 1978b: A comparison of several Anti-inflammatory Drugs Regarding Their Ability to inhibit Prostaglandin Synthesis and Release from Macrophages, Europ. J. Rheumatol. Inflamm., 1, 308-311.

BORGEAT, P., HAMBERG, M, SAMUELSSON, B., 1976: Transformation of arachidonic acid and homo-y-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes, J. biol. Chem., 251, 7816-7820.

BORGEAT, P., SAMUELSSON, B., 1979a: Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A 23187. Proc. nat. acad. Sci. (Wash.), 76, 2148-2152.

BORGEAT, P., SAMUELSSON, B., 1979b: Arachidonoic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Unstable intermediate in formation of dihydroxy acids, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 76, 3213-3217.

BORGEAT, P. and SAMUELSSON, B., 1979c: Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes, J. Biol. Chem., 254, 2643-2646.

BORGEAT, P., FRUTEAU DE LACLOS, B., PICARD, S., VALLERAND, P., SIROIS, P., 1982: Double Dioxygenation of Arachidonic Acid in Leukocytes by Lipoxygenases. In: Leukotrienes and Other Lipoxygenase Products (Hrsg.: Samuelsson, B., R. Paoletti) Raven Press, New York, S. 45-51.

BORGEAT, P., FRUTEAU DE LACLOS, B., MACLOUF, J., 1983: New Concepts in the Modulation of Leukotriene Synthesis, Biochem. Pharmacol., 32, 381-387.

BRAY, M.A. and D. GORDON, 1978: Prostaglandin production by macrophages and the effect of anti-inflammatory drugs, Br. J. Pharmac., 63, 635-642.

BRAY, M.A., FORD-HUTCHINSON, A.W., SHIPPLEY M.E., SMITH, M.J.H., 1980: Calcium ionophore A23187 induces release of chemokinetic and aggregating factors from polymorphonuclear leucocytes, Br. J. Pharmac., 71, 507-512.

BRAY, M.A., FORD-HUTCHINSON, A.W., SMITH, M.J.H., 1981: Leukotriene B_4: Biosynthesis and Biological Activities, SRS-A and Leukotrienes (Hrsg. P.J. Piper), S. 253-269.

BRUNE, K., GLATT, M., KALIN, H., PESKAR, B.A., 1978: Pharmacological control of prostaglandin and thromboxane release from macrophages. Nature (London), 274, 261-263.

BRUNE, K., RAINSFORD, K.D., PESKAR, B.A., 1979: Prostaglandinrelease from macrophages: modulation by antiinflammatory drugs. In: Prostaglandins and Inflammation (Hrsg. K.D. Rainsford, A.W. Ford-Hutchinson) Agents and Actions, Suppl. 6, Birkhäuser Verlag, Basel, 159-165.

BRUNE, K., RAINSFORD, K.D., WAGNER, K., PESKAR, B.A., 1981: Inhibition by Anti-Inflammatory Drugs of Prostaglandin Production in Cultured Macrophages, Factors Influencing the Apparent Drug Effects, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 315, 269-278.

BRUNE, K., AEHRINGHAUS, U., PESKAR, B.A., 1984: Pharmacological Control of Leukotriene and Prostaglandin Production from Mouse Peritoneal Macrophages, Agents and Actions, 14, 729-734.

BRYANT, R.W. and J.M. BAILEY, 1980: Isolation of Glucose-Sensitive Platelet Lipoxygenase Products from Arachidonic Acid, Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 6, (Hrsg. B. Samuelsson, R.P. Ramwell and R. Paoletti), S. 95-99.

BURSTEIN, S., LEVIN, E. VARANELLI, C., 1973: Prostaglandins and cannabis. II. Inhibition of biosynthesis by the naturally occuring cannabinoids, Biochem. Pharmacol., 22, 2905-2910.

CARNUCCIO, R., DiROSA, M., PERSICO, P., 1980: Hydrocortisone-induced inhibitor of prostaglandin biosynthesis in rat leukocytes. Brit. J. Pharmacol., 68, 14-18.

CLAESSON,H.-E., LUNDBERG, U., MALMSTEN, C. 1981: Serum-coated zymosan stimulates the synthesis of leukotriene B_4 in human polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by cyclic-AMP, Biochem. Biophys. Res. Com., 99, 1230-1237.

COLLIER, H.O.J., 1974: Prostaglandin synthetase inhibitors and the gut. In: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, pp. 121-133, New York, Raven Press.

DEBY, C., DESCAMPS, M., BINON, F., BACQ, Z.M., 1975: Correlation between anti-inflammatory properties and inhibition of prostaglandin biosynthesis in vitro. Biochem. Pharmacol., 24, 1089-1092.

DICZFALUSY, U., FALARDEAU, P., HAMMARSTRÖM, S., 1977: Conversion of prostaglandin endperoxides to C_{17}-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthetase, Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 84, 271-274.

DOIG, M.V. and A.W. FORD-HUTCHINSON, 1980: The production and characterisation of products of the lipoxygenase enzyme system released by rat peritoneal macrophages, Prostaglandins, 20, 1007-1019.

DUSTING, G.J., MONCADA, S., VANE, J.R., 1977: Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. Prostaglandins, 13, 3-15.

DUSTING, G.J., MONCADA, S., VANE, J.R., 1978: Vascular actions of arachidonic acid and its metabolites in perfused mesenteric and femoral beds of the dog. Eur. J. Pharmacol., 49, 65-72.

EAKINS, K.E., KULKARNI, P.S., 1977: Selective inhibitory actions of sodium-p-benzyl-4-[1-oxo-2-(4-chlorobenzyl)-3-phenylpropyl]-phenylphosphonate (N-0164) and indomethacin on the biosynthesis of prostaglandins and thromboxanes from arachidonic acid. Brit. J. Pharmacol., 60, 135.

FERREIRA, S.H. and J.R. VANE, 1979: In: Anti-inflammatory Drugs, Handbook of Exp. Pharm. 50 II, Hrsg. J.R. Vane, S.H. Ferreira, Springer-Verlag, Berlin, 376.

FLOWER, R.J., GRYGLEWSKI, R., HERBACZYNSKA-CEDRO, K., VANE, J.R., 1972a: Effects of antiinflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. Nature (London), 238, 104-106.

FLOWER, R.J. and J.R. VANE, 1972b: Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature (Lond.), 240, 410-411.

FLOWER, R.J., CHEUNG, H.S., CUSHMAN, D.W., 1973: Quantative determination of prostaglandins and malonyldialdehyde formed by arachidonate oxygenase system in bovine seminal vesicles, Prostaglandins, 4, 325-341.

FLOWER, R.J. and G.J. BLACKWELL, 1976: The importance of phospholipase A_2 in prostaglandin biosynthesis. Biochem. Pharmacol., 25, 285-291.

FLOWER, R.J. and G.J. BLACKWELL, 1979: Antiinflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A_2 inhibitor, which prevents prostaglandin generation. Nature (Lond.), 278, 456-459.

FLOWMAN, Y. and U. ZOR, 1976: Mechanism of steroid action in inflammation: Inhibition of prostaglandin synthesis and release, Prostaglandins, 12, 403.

FORD-HUTCHINSON, A.W., BRAY, M.A., DOIG, V.M., SHIPLEY, M.E., SMITH, M.J.H., 1980a: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature (Lond.), 286, 264-265.

FORD-HUTCHINSON, A.W., BRAY, M.A., SMITH, M.J.H., 1980b: Lipoxygenase Products and the Polymorphonuclear Leucocyte, Agents and Actions, 10, 548-550.

FRUCHTMANN, R., KRUPKA, U., PELSTER, B., 1984: Hemmung des Lipogenase- und Cyclooxygenaseweges im Arachidonsäuremetabolismus durch Etofenamat, Akt. Rheumatol., 9, 165-168.

GAUT, Z.N., BARUTH, H., RANDALL, L.O., ASHLEY, C., PAULSRUD, J.R., 1975: Stereometric relationships among anti-inflammatory activity, inhibition of platelet aggregation, and inhibition of prostaglandin synthetase, Prostaglandins, 10, 59-66.

GORMAN, R.R. BUNDY, G.L., PETERSON, D.C., SUN, F.F., MILLER, O.V., FITZPATRICK, F.A., 1977: Inhibition of human platelet thromboxane synthetase by 9,11-azoprosta-5,15-dienoic acid. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 74, 4007-4011.

GRYGLEWSKI, R.J., 1974: Structure-activity relationships of some prostaglandin synthetase inhibitors. In: Prostaglandin synthetase inhibitors, pp. 33-52, New York, Raven Press.

GRYGLEWSKI, R.J., BUNTING, S., MONCADA, S., FLOWER, R.J., VANE, J.R., 1976: Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endperoxides, Prostaglandins, 12, 685-714.

GRYGLEWSKI, R.J., ZMUDA, A., KORBUT, R., KRECIOCH, E., BIERON, K., 1977: Selective inhibition of thromboxane A_2 biosynthesis in blood platelets, Nature (Lond.), 267, 627-628.

GRYGLEWSKI, R.J., 1978: Screening and Assessment of the Potency of Anti-Inflammatory Drugs in vitro, (Hrsg. J.R. Vane u. S.H. Ferreira), Handbook of experim. Pharmacology, Vol. 50 II, Springer Verlag, New York, S. 3-43.

HAM, E.A., Cirillo, K.J., ZANETTI, M., SHEN, T.Y., KUEHL, F.A., 1972: Studies on the mode of action of non-steroidal anti-inflammatory agents. In: Prostaglandins in cellular biology, pp. 345-352, New York, Plenum Press.

HAMBERG, M. und B. SAMUELSSON, 1974: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 71, 3400-3404.

HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B., 1975: Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 72, 2994-2998.

HAMMARSTRÖM, S:, 1977: Selective inhibition of platelet n-8 lipoxygenase by 5,8,11-eicosatriynoic acid. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 487, 517-519.

HAMMARSTRÖM, S., MURPHY, R.C., SAMUELSSON, B., CLARK, D.A., MIOSKOWSKI, C., COREY, F.J., 1979: Structure of Leukotriene C: identification of the amino acid part, Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 1266-1272.

HANSSON, G., LINDGREN, J.A., DAHLEN, S.E., HEDQVIST, P, SAMUELSSON, B., 1981: Identification and biological activity of novel ω-oxidized metabolites of leukotriene B_4 from human leukocytes, FEBS Letters, 130, 107-112.

HARVEY, J. and D.J. OSBORNE, 1983: A Rapid Method for Detecting Inhibitors of Both Cyclooxygenase and Lipoxygenase Metabolites of Arachidonic Acid, Journal of Pharmacological Methods, 9, 147-155.

HIGGS, G.A., McCALL, E., YOULTEN, L.J.F., 1975: A chemotactic role of prostaglandins released from polymorphonuclear leucocytes during phogocytosis, Brit. J. Pharmacol., 53, 539-546.

HIGGS, G.A., FLOWER, R.J., VANE, J.R., 1979: A new approach to antiinflammatory drugs, Biochem. Pharmacol., 28, 1959-1961.

HIRATA, F., SCHIFFMANN, E., VENKATASUBRAMANIAN, K., SOLOMON, D., AXELROD, J., 1980: A phospholipase A_2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticosteroids, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 77, 2533-2536.

HJORTH, R., JONSSON, A.K, VRETBLAD, P., 1981: A rapid method for purification of human granulocytes using Percoll®. A comparison with dextran sedimentation, J. Immun. Meth., 48, 95-101.

HO, P.P. and M.A. ESTERMANN, 1974: Fenoprofen: inhibition of prostaglandin synthesis, Prostaglandins, 6, 107-113.

HONN, K.Y. and J.R. DUNN, 1982: Nafazatrom (Bay g 6575) inhibition of tumor cell lipoxygenase activity and cellular proliferation. FEBS Letters, 139, 65-69.

HORODNIAK, J.W., JULIUS, M., ZAREMBO, J.E., BENDER, D., 1974: Inhibitory effects of aspirin and indomethacin in the biosynthesis of PGE_2 and PGF_2 , Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 539-545.

HUMES, J.L., BONNEY, R.J., PELUS, L., DAHLGREN, M.E., SADOWSKI, S.J., KUEHL, F.A., DAVIS, P., 1977: Macrophages synthesise and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. Nature (London), 269, 149-151.

HUMES, J.L., DAVIES, P., BONNEY R.J., KUEHL, F.A., 1978: Phorbol Myristate Acetate (PMA) stimulates the release of arachidonic acid and its cyclooxygenation products by macrophages, Fed. Proc., 37, 1318.

HUMES, J.L., HAM, E.A., EGAN, R.W., BONNEY, R.J., DAVIES, P., KUEHL, Jr., F.A., 1979: Pathways of arachidonic acid metabolism and modulation by drugs, Agents and Actions, 4, [Suppl.], 96-109.

HUMES, J.L., WINTER, C.A., SADOWSKI, S.J., KUEHL, jr. F.A., 1981: Multiple sites on prostaglandin cyclooxygenase are determinants in the action of non-steroidal antiinflammatory agents. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 78, 2053.

HUMES, J.L., SADOWSKI, S., GALAVAGE, M., GOLDENBERG, M., SUBERS, E., BONNEY, R.J., KUEHL, F.A., Jr., 1982: Evidence for Two Sources of Arachidonic Acid for Oxidative Metabolism by Mouse Peritoneal Macrophages, J. Biol. Chem., 257, 1591-1594.

HUMES, J.L., SADOWSKI, S., GALAVAGE, M., GOLDENBERG, M., SUBERS, E., KUEHL, Jr., F.A., BONNEY, R.J., 1983: Pharmacological effects of non-steroidal antiinflammatory agents on prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse peritoneal macrophages, Biochemical Pharmacology, 32, 2319-2322.

HUMPHRAY, H.P., COOTE, J., BUTCHERS, P.R., WHEELDON, A., VARDEY, C.J., SKIDMORE, I.F., 1981: The release of prostaglandin and slow reacting substance from mouse macrophages, Agents and Actions, 11, 577-578.

JONES, B.L., KERRY, P.J., POYSER, N.L., WALKER, I.C., WILSON, N.H., 1978: The identification of trihydroxyeicosatrienoic acids as products from the incubation of arachidonic acid with washed blood platelets, Prostaglandins, 16, 583-589.

KU, E.C. and J.M. WASVARY, 1975: Inhibition of prostaglandin synthetase by pirprofen. Studies with sheep seminal vesicle enzyme. Biochim. Biophys. Acta, 384, 360-368.

KUEHL, F.A., HUMES, J.L., EGAN, R.W., HAM, E.A., BEVERIDGE, G.C., VAN ARMAN, C.G., 1977: Role of prostaglandin endoperoxide PGG_2 in inflammatory processes, Nature (London), 265, 170-173.

KUEHL, F.A., Jr., HUMES, J.L., HAM, E.A., EGAN, R.W., DOUGHERTY, H.W., 1980: Inflammation: The Role of Peroxidase-Derived Products, In: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 6, Hrsg. B. Samuelsson, P.W. Ramwell, R. Paoletti, Raven Press, New York, 77-86.

KUNZE, H., BOHN, E., VOGT, W., 1974: Effects of local anaesthetics on prostaglandin biosynthesis in vitro, Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 360, 260-266.

LANDS, W.E.M., LeTELLIER, P.R., ROME, L.H., VANDERHOEK, J.Y., 1973: Inhibition of prostaglandin biosynthesis. Advanc. Biosci. 9, 15.

LANDS, W.E.M., 1979: The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. Ann. Rev. Physiol., 41, 633.

LANDS, W.E.M. and A.M. HANEL, 1982: Phenolic anticyclooxygenase agents in anti-inflammatory and analgesic therapy, Prostaglandins, 24, 271.

LINDGREN, J.A., HANSSON, G., SAMUELSSON, B., 1981: Formation of novel hydroxylated eicosatetraenoic acids in preparations of human polymorphonuclear leukocytes, FEBS Letters, 128, 329-335.

MARDIN, M. and W.-D. BUSSE, 1983: Effect of Nafazatrom on the Lipoxygenase pathways in PMN leukocytes, Prostaglandins Ser., 263-274.

MEACOCK, S.C.R. and E.A. KITCHEN, 1979: Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug benoxaprofen on leucocyte migration, J. Pharm. Pharmacol., 31, 366-370.

MELBY, J.C., 1977: Clinical Pharmacology of systemic glucocorticoids, Ann. Rev. Pharmacol. Tox., 17, 511.

MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R.J., BUNTING, S., VANE, J.R., 1976a: A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. Prostaglandins, 12, 715-733.

MONCADA, S., NEEDLEMAN, P. BUNTING, S., VANE, J.R., 1976b: Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. Prostaglandins, 12, 323-325.

MORRIS, H.R., TAYLOR, G.W., PIPER, P.J., SIROIS, P., TIPPINS, J.W., 1978: Slow reacting substance of anaphylaxis. Purification and characterisation, FEBS Letters, 87, 203-206.

MURPHY, R.C., HAMMARSTRÖM, S., SAMUELSSON, B., 1979: A slow reacting substance of murine mastocytoma cells. Proc. nat. Acad. Sci (Wash.), 76, 4275-4279.

MYERS, R.F. and M.I. SIEGEL, 1983: Differential effects of anti-inflammatory drugs on lipoxygenase and cyclooxygenase activities of neutrophils from a reverse passive arthus reaction, Biochemical and Biophysical Research Communications, 112, 586-594.

NEWBOULD, B.B., 1963: Chemotherapy of Arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant, Brit. J. Pharmacol., 21, 127-130.

NUGTEREN, D.H. und E. HAZELHOF, 1973: Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 326, 448-461.

NUTGEREN, D.H., 1975: Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 380, 299-307.

PANGANAMALA, R.V., MILLER, J.S., GWEBU, E.T., SHARMA, H.M., CORNWELL, D.G., 1977: Differential inhibitory effects of vitamin E and other antioxidants on prostaglandin synthetase, platelet aggregation and lipoxidase, Prostaglandins, 14, 261-271.

PAYNE, T.G., DEWALD, B., SIEGL, H., GRUBLER, H.U., OTT, H., BAGGIOLINI, M., 1982: Radical scavenging and stimulation of prostaglandin synthesis not antiinflammatory? Nature (Lond.), 296, 160-162.

PHARMACIA FINE CHEMICALS, Percoll®, 1980, Produkt-Information.

RÅDMARK, O., MALMSTEN, C., SAMUELSSON, B., CLARK, D.A., GOTO, G., MARFAT, A., COREY, E.J., 1980: Leukotriene A: Stereochemistry and conversion to leukotriene B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 954-961.

RAJTAR, G. and G. DeGAETANO, 1978: Tranylcypromine is not a selctive inhibitor of prostacyclin in rats. Thrombos. Res., 14, 245-248.

RANDALL, R.W., EAKINS, K.E., HIGGS, G.A., SALMON, J.A., TATESON, J.E., 1980: Inhibition of Arachidonic Acid Cyclo-Oxygenase and Lipoxygenase activities of Leukocytes by Indomethacin and Compound BW 755C, Agents and Actions, 10, 553-555.

RANDALL, M.J., PARRY, M.J., HAWKESWOOD, E., CROSS, P.E., DICKINSON, R.P., 1981: UK-37,248, a novel, selective thromboxane synthetase inhibitor, with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity. Thrombos. Res., 23, 145.

RAZ, A., STERN, H., KENIG-WAKSHAL, R., 1973: Indomethacin and aspirin inhibition of prostaglandin E_2 synthesis by sheep seminal vesicles microsome powder and seminal vesicle slice. Prostaglandins, 3, 337-352.

RICK, W., 1977: Klinische Chemie und Mikroskopie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

RIGUAD, M., DURAND, H., BRETON, J.C., 1979: Transformation of Arachidonic Acid into 12-Hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic Acid by Mouse Peritoneal macrophages, Biochim. Biophys. Acta, 573, 408-412.

ROTH, R.G., STANFORD, N., MAJERUS, P.W., 1975: Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 72, 3073.

ROUBIN, R. and J. BENVENISTE, 1981: Release of leukotrienes C (LTC) and D (LTD) from inflammatory macrophages during phagocytosis of zymosan and bacteria, Agents and Actions, 11, 578-579.

ROUBIN, R., MENCIA-HUERTA, J.M., BENVENISTE, J., 1982: Release of platelet-activating factor (PAF-acether) and leukotrienes C and D from inflammatory macrophages, Eur. J. Immunol., 12, 141-146.

ROUZER, C.A., SCOTT, W.A., COHN, Z.A., BLACKBURN, P., MANNING, J.M., 1980: Mouse peritoneal macrophages release leukotriene C in response to a phagocytic stimulus, Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4928-4932.

ROUZER, C.A., SCOTT, W.A., GRIFFITH, O.W., HAMILL, A.L., COHN, Z.A., 1981: Depletion of glutathione selectively inhibits synthesis of leukotriene C by macrophages, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 78, 2532-2536.

RUFER, C., BAHLMANN, F., SCHRÖDER, E., BÖTTCHER, I., 1982a: Nichtsteroidale Entzündungshemmer. 8. Entzündungshemmende Methansulfonanilide III., Europ. J. Med. Chem. - Chim. Ther., 17, 173-180.

RUFER, C., SCHILLINGER, E., BÖTTCHER, I., REPENTHIN, W., HERRMANN, Ch., 1982b: Non-steroidal anti-inflammatories - XII, Mode of action of anti-inflammatory methane sulfonanilides, Biochem. Pharmacol., 31, 3591-3596.

SAMUELSSON, B. und M. HAMBERG, 1966: Prostaglandins in human seminal plasma, J. Biol. Chem., 241, 257-263.

SAMUELSSON, B., GRANSTRÖM, E., HAMBERG, M., 1967: On the mechanism of biosynthesis of protaglandins. In: Nobel Symposium 2, Prostaglandins, pp. 31-44, Stockholm: Almqvist and Wiksell.

SAMUELSSON, B., BORGEAT, P., HAMMARSTRÖM, S., MURPHY, R.C., 1979: Introduction of a nomenclature: leukotrienes, Prostaglandins, 17, 785-787.

SAMUELSSON, B. and S. HAMMARSTRÖM, 1980: Nomenclature for leukotrienes, Prostaglandins, 19, 645-648.

SCHRÖDER, E., LEHMANN, M., RUFER, C., BÖTTCHER, I., 1982a: Nichtsteroidale Entzündungshemmer 6., Entzündungshemmende Methansulfonanilide I, Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther., 17, 35-42.

SCHRÖDER, E., LEHMANN, M., RUFER, C., BÖTTCHER, I., 1982b: Nichtsteroidale Entzündungshemmer 7., Entzündungshemmende Methansulfonanilide II, Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther., 17, 165-172.

SCHRÖR, K., 1983: Prostaglandine, G. Thieme Verlag, Stuttgart.

SIEGEL, M.I., McCONNELL, R.T., BONSER, R.W., CUATRECASAS, P., 1981: The production of 5-HETE and leukotriene B in rat neutrophils from carrageenan pleural exudates, Prostaglandins, 21, 123-132.

SMITH, W.L. und W.E.M. LANDS, 1971: Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis, J. biol. Chem., 246, 6700-6702.

STENSON, W.F. und C.W. PARKER, 1979: Metabolism of arachidonic acid in ionophore stimulated neutrophils - esterification of a hydroxylated metabolite into phospholipids, J. clin. Invest., 64, 1457-1465.

SUN, F.F., McGUIRE, J.C., MORTON, D.R., PIKE, J.E., SPRECHER, H., KUNAU, W.H., 1981: Inhibition of platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase by acetylenic acid compounds. Prostaglandins, 21, 333-343.

SWINGLE, I., HAMILTON, K.F., HARRINGTON, J.K., KVAM, D.C., 1971: 3-Benzoyldifluoromethanesulfonanilide, Sodium Salt (Diflumidone Sodium, MBR 4164-8): A New Anti-Inflammatory Agent, Arch. Int. Pharmacodyn, 189, 129-144.

SWINGLE, I., MOORE, G.G.I., GRANT, T.J., 1976: 4-Nitro-2-Phenoxymethanesulfonanilide (R-805): a Chemically Novel Anti-Inflammatory Agent, Arch. int. Pharmacodyn, 221, 132-139.

TAKEGUCHI, C., KOHONO, E., SIH, C.J., 1971: Mechanism of prostaglandin biosynthesis, I. Charaterization and assay of bovine prostaglandin synthetase. Biochemistry, 10, 2372-2376.

TAKEGUCHI, C. and C.J. SIH, 1972: A rapid spectrophotometric assay for prostaglandin synthetase: application to the study of non-steroidal anti-inflammatory agents. Prostaglandins, 2, 169-184.

TOBIAS, L.D. and J.G. HAMILTON, 1979: The effect of 5,8,11,14-eicosatetraynoic acid on lipid metabolism, Lipids, 14, 181-193.

TOMLINSON, R.V., RINGOLD, H.J., QUERSHI, M.C., FORCHIELLI, E., 1972: Relationship between inhibition of prostaglandin synthetis and drug efficacy: support for the current theory on mode of action of aspirin-like drugs, Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 552-559.

VANDERHOEK, J.Y., BRYANT, R.W., BAILEY, J.M., 1980a: 15-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid: a potent and selective inhibitor of platelet lipoxygenase. J. biol. Chem., 255, 5996-5999.

VANDERHOEK, J.Y., BRYANT, R.W., BAILEY, J.M., 1980b: Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. J. biol. Chem., 255, 10064-10065.

VANE, J.R., 1971: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, Nature (New Biol.), 231, 232-235.

VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G., BOLDINGH, J., 1977: Prog. Chem. Fats Other Lipids, 15, 131-166.

VIGDAHL, R.L. and H. TUKEY, 1977: Mechanism of action of novel anti-inflammatory drugs diflumidone and R-805, Biochem. Pharmacol., 26, 307-311.

WALKER, J.R. und W. DAWSON, 1979: Inhibition of rabbit PMN lipoxygenase activity by benoxaprofen, J. Pharm. Pharmacol., 31, 778-780.

WALKER, J.R., BOOT, J.R., COX, B., DAWSON, W., 1980: Inhibition of the release of slow-reacting substance of anaphylaxis by inhibitors of lipoxygenase activity, J. Pharm. Pharmacol., 32, 866-867.

WALKER, J.R. and W. DAWSON, 1981: Inhibitory effect of benoxaprofen and BW 755C on rabbit PMN leukocyte lipoxygenase. In: Inflammation: Mechanisms and Treatment, Chapt. 38, ed. by D.A. Willoughby, J.P. Giroud, MTP Press, Lancaster.

WALLACH, D.P. und E.G. DANIELS, 1971: Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles, Biochim. Biophys. Acta, 231, 445-457.

WEBB, D.R., WIEDER, K.J., NOWOWIEJSKI, J., 1981: in: Advances in Immunpharmacology (Hrsg. Hodden, L., Chedid, P. Mullen and F. Spreafico), p. 383.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W., 1962: Carrageenin Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544-547.

YOUNG, P.R., DODGE, P.W., CARTER, G.W., KIMURA, E.T., 1974: Experimental anti-inflammatory and analgesic studies with 3-trifluoromethyl-s-triazolo(3,4-)-isoquinoline, Arch. int. Pharmacodyn., 212, 205-213.

LEBENSLAUF

Name:	Werner, Harald
Geburtsdatum/-ort:	10. September 1954 in Köln
Eltern:	Hans-Joachim Werner, Apotheker und Lebensmittelchemiker, Irmgard Werner geb. Fromme, Apothekerin
Familienstand:	seit dem 29. Juli 1983 verheiratet mit Martina Menzel, 2. Dezember 1983 Geburt der Tochter Lisa

Schulbildung:

1961 - 1967	Rudolf Steiner Schule, Bochum
1967 - 1974	Albert Martmöller Gymnasium, Witten
10. Juni 1974	Abitur

Beruflicher Werdegang:

WS 1974/75	Studium der Chemie und Biologie, Ruhr-Universität, Bochum
SS 1975 - SS 1978	Studium der Pharmazie, Freie Universität, Berlin
12. Oktober 1978	2. Staatsexamen
	Pharmaziepraktikum:
April - September 1979	Schering AG, Berlin
Oktober 1979 - März 1980	Altstadt-Apotheke, Berlin
27. Juni 1980	3. Staatsexamen
4. Juli 1980	Approbation als Apotheker
Februar 1981	Beginn der vorliegenden Dissertation
seit 15. Oktober 1981	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität, Berlin